ZUR AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE MIT IMMOBILISIERTEN ADENOSINDERIVATEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

des Fachbereichs Chemie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

JAN BECKER

aus Karlsbad

1976

ZUR AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE MIT IMMOBILISIERTEN ADENOSINDERIVATEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

des Fachbereichs Chemie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

JAN BECKER

aus Karlsbad

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Januar 1971 bis März 1975 am Biochemischen Institut im Fachbereich Medizin (früher: Institut für Physiologische Chemie und Physikochemie) der Universität Kiel unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Friedrich Klink durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Gutachter: Herr Professor Dr. E. Piedel

2. Gutachter: Herr Professor Dr. H.-J. Risse

3. Gutachter: Herr Professor Dr. F. Klink

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 1976

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung..... 1

2. Hauptteil..... 4
2.1. Die Affinitätschromatographie mit N^6-(6-Amino-2-hexenyl)-adenosin-Agarose..... 4
2.1.1. Vorbemerkungen..... 4
2.1.2. Die Synthese von N^6-(6-Amino-2-hexenyl)-adenosin.. 8
2.1.3. Die kinetischen Konstanten des AHA..... 12
2.1.4. Vorversuche..... 15
2.1.5. Vergleichsläufe an AHA-Sepharose..... 19
2.1.6. Versuche an mit unspezifischen Liganden beladener Agarose..... 25
2.2. Die Affinitätschromatographie mit N^6-(2,3-Dihydroxy-6-aminohexyl)-adenosin-Agarose..... 30
2.2.1. Die Synthese von N^6-(2,3-Dihydroxy-6-aminohexyl)-adenosin..... 30
2.2.2. Vergleichsläufe an DHAHA-Sepharose..... 33
2.3. Die Isolierung von ADA aus biologischem Material.. 36
2.3.1. ADA aus der Schleimhaut von Kälberdärmen..... 36
2.3.2. ADA aus Rattenleber..... 42

3. Diskussion..... 45

4. Zusammenfassung..... 58

5. Beschreibung der Versuche..... 61

6. Literaturverzeichnis..... 81

7. Abkürzungen..... 85

8. Danksagung..... 86

9. Lebenslauf..... 87

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547205_0064

Einleitung

In der lebenden Zelle läuft ständig eine große Zahl von chemischen Reaktionen ab, was sich in dem weiten Spektrum der verschiedenen Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, widerspiegelt. So ist die Isolierung eines einheitlichen, reinen Enzyms aus Zellhomogenaten, die ja nicht nur all diese Enzyme, sondern darüberhinaus noch Proteine mit anderen Funktionen enthalten, eine der mühevollsten Aufgaben in der Biochemie.

Die üblichen Trennverfahren nützen Unterschiede in physikalischen Parametern der zu trennenden Substanzen aus. Jedoch ist einsichtig, daß sie bei der anfallenden Vielfalt höchstens ein Gemisch in einer Meßgröße gleicher oder ähnlicher Proteine liefern. Eine befriedigende Anreicherung eines Enzyms wird nur durch die Kombination mehrerer Trennprinzipien möglich sein.

Jedoch bietet sich gerade zur Enzymisolierung die bei enzymatischen Reaktionen übliche außerordentlich hohe Spezifität, mit der ein Enzym "sein" Substrat erkennt, als chemisches Trennprinzip an. Wählt man ein chromatographisches Verfahren, bei dem das Substrat kovalent an einen unlöslichen Träger gebunden ist und läßt die Lösung eines Proteingemisches an ihm vorbeilaufen, so sollte nur dieses eine Enzym an sein Substrat gebunden werden, alle anderen Proteine sollten unbeeinflußt im Eluat erscheinen. Dieses Trennverfahren hat in den letzten Jahren unter dem Namen "Affinitätschromatographie" Eingang in die Laborpraxis gefunden.

Inhibitoren, die ja auch eine Bindung mit dem Enzym eingehen, sollten nach ihrer Immobilisierung das betreffende Enzym nach demselben Mechanismus anlagern und somit für affinitätschromatographische Verfahren verwendet werden

können. Schon die kovalente Bindung an die Matrix modifiziert ja das Substrat, so daß es nicht mehr in der ursprünglichen Form vorliegt. Allgemein wird bei diesem Verfahren also die Wechselwirkung eines Enzyms mit einem Effektor ausgenützt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Leistungsfähigkeit dieser Methode anhand eines ausgewählten Beispiels zu untersuchen. Als Substrat sollte Adenosin immobilisiert werden und die Wirksamkeit des so gewonnenen Affinitätssorbens mit Adenosin-aminohydrolase (EC 3.5.4.4; "Adenosin-deaminase", "ADA") untersucht werden. Die Entscheidung für dieses Enzym-Substrat-Paar erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten.

Adenosinderivaten kommt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel zu. Als wichtigste seien hier nur genannt:

1.) Adenosin-5'-triphosphat (ATP);
2.) Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD®) und seine Abkömmlinge;
3.) Coenzym A und seine Acylderivate;
4.) Adenosin-3',5'-cyclophosphat (cycl. AMP).

Ideale Affinitätschromatographie, bei der die Trennung ausschließlich diesem Retentionsmechanismus gehorcht, ist in den seltesten Fällen zu verwirklichen. Vor allem zwei Effekte beeinträchtigen die Wirksamkeit der Trennung:

1.) Ionisierbare Gruppen im Affinitätssorbens bewirken zusätzlich einen Ionentausch. Diese Gruppen können bei der Synthese des Sorbens entstehen, zu beachten ist aber auch, daß geladene Liganden unweigerlich "fremde" Proteine durch Ionenbindung festhalten werden (Rood und Wilkinson; 1974). Diese Tatsache war mit ein entscheidender Gesichtspunkt bei der Auswahl

des im physiologischen pH-Bereichs ungeladenen Adenosin als Ligand.

2.) Bei der Synthese des Affinitätssorbens können in ihm manchmal hydrophobe Bezirke entstehen, mit denen solche Proteine, die über ebenfalls hydrophobe Bereiche in ihrer Oberfläche verfügen, in Wechselwirkung treten. Dieser Effekt war in einzelnen Fällen so stark, daß hierfür der Name "Hydrophobe Chromatographie" eingeführt worden ist (Er-el e.a.; 1972).

Die eingehende Untersuchung dieser zusätzlichen Wirkungen könnte zu Ergebnissen führen, die nicht nur auf den Fall der Affinitätschromatographie von Adenosin-aminohydrolase an immobilisiertem Adenosin anwendbar sind.

2. Hauptteil

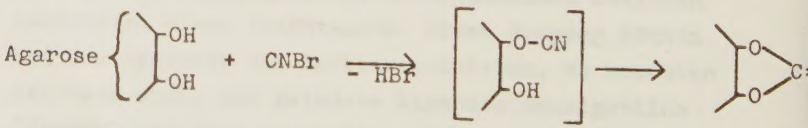
2.1. Die Affinitätschromatographie mit N^6-(6-Amino-2-hexenyl)-adenosin-Agarose

2.1.1. Vorbemerkungen

Will man die Bindung eines Enzyms an einen immobilisierten Effektor aufgrund biospezifischer Erkennung untersuchen, so muß man bestrebt sein, alle anderen Wechselwirkungen zwischen Sorbens und Proteinen so weit wie möglich auszuschalten. Das führt zu folgenden Forderungen an Matrix und Ligand:

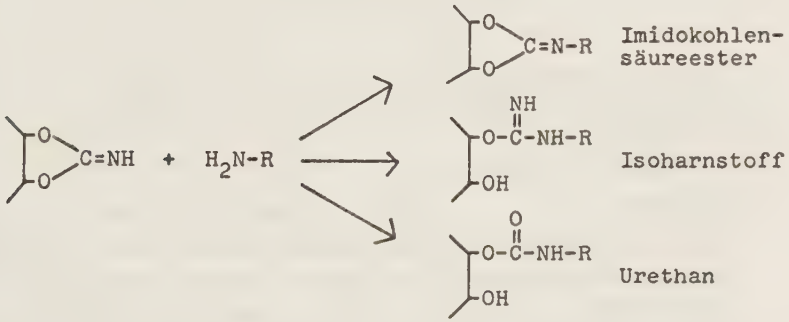
Die Matrix muß hydrophil sein und ein großräumiges Maschenwerk darstellen, damit auch große Moleküle in ihre Poren eindringen können und somit die wirksame Oberfläche größer wird. Diesen Anforderungen entsprechen Agarosegele am weitestgehenden.

Die kovalente Bindung eines Effektors an die Matrix setzt die chemische Modifizierung eines der beiden Partner voraus, damit in ihm eine funktionelle Gruppe ausreichender Reaktivität erzeugt wird. Die nucleophilen Hydroxylgruppen der Agarose erfordern elektrophile Gruppen im Liganden, die meistens nur schwierig einzubringen sind. Wesentlich einfacher gelingt das in der Agarose. Durch Reaktion mit Cyansäurebromid entstehen in ihr Imidokohlensäureestergruppen (Axén e.a.; 1967):



Diese können jetzt mit nucleophilen Gruppen des Liganden reagieren. Hierfür kommen vor allem Hydroxyl- oder pri-

märe Aminogruppen in Frage, wobei letztere wegen der geringeren Elektronegativität des Stickstoffs im Vergleich zum Sauerstoff bevorzugt reagieren. Die chemische Natur der Reaktionsprodukte bromcyan-aktivierter Agarose mit primären Aminen ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt, folgende Strukturen kommen in Frage:



Dabei ist es am wahrscheinlichsten, daß die Isoharnstoffgruppierung entsteht (Svensson; 1973).

Durch Reaktion der aktivierten Matrix mit primären Aminogruppen des Liganden wird also die gewünschte kovalente Bindung des Effektors erreicht. Jedoch ist dieser jetzt an der Geloberfläche fixiert, was die genügende Annäherung des im Vergleich großen Enzymmoleküls aus sterischen Gründen erschwert oder unmöglich macht. Trennungen aufgrund biospezifischer Erkennung werden so in den wenigsten Fällen erfolgreich sein. Man wird daher den Effektor über eine Alkylkette ("spacer") in genügenden Abstand von der Geloberfläche bringen. Ein solcher spacer benötigt an der einen Seite die zur Bindung an die aktivierte Matrix erforderliche Aminogruppe, an der anderen eine funktionelle Gruppe, die die Anknüpfung des Liganden erlaubt, z.B. eine Amino- oder eine Carboxylgruppe. Die Länge der Alkylkette spielt ebenfalls eine Rolle. Cuatrecasas (1970) hat gezeigt, daß eine Kette aus sechs Koh-

lenstoffatomen ein Optimum darstellt. Kürzere Ketten ermöglichen noch nicht den ungehinderten Zugang des Enzymmoleküls, längere Ketten verknäueln und machen den gewünschten Effekt zunichte.

Zur Darstellung eines Affinitätssorbens sind also zwei kovalente Bindungen zu knüpfen:
1.) Die Bindung zwischen dem Effektor und dem spacer;
2.) die Bindung zwischen dem spacer und der Matrix.
Dabei spielt die Reihenfolge eine wichtige Rolle. Bindet man erst den spacer an die Matrix und anschließend den Liganden an den spacer, hat man folgende Nachteile in Kauf zu nehmen:

1.) Die Reaktion zwischen Effektor und spacer kann unvollständig sein. Das führt einerseits zu einer geringeren Beladung des Sorbens mit Ligand, andererseits verbleiben im Gel die funktionellen Endgruppen des spacers, die im Falle von Amino- oder Carboxylgruppen einen Ionentauscheffekt bewirken würden.
2.) Die Bindung des Liganden an die erwähnten funktionellen Gruppen des spacers erfordert ziemlich drastische chemische Reaktionen. Bei gleichzeitiger Anwesenheit mehrerer gleichartiger oder ähnlicher Gruppen im Effektormolekül - Adenosin z.B. trägt eine primäre, zwei sekundäre Hydroxyl- und eine primäre Aminogruppe - verläuft die Reaktion uneinheitlich und es besteht die Gefahr, daß für die Bindung des Enzymmoleküls essentielle Gruppen blockiert werden.

Diese Reihenfolge wählten Barry und O'Carra (1973a) bei der Synthese ihres Affinitätssorbens mit einem immobilisierten 6-Thioanalogen des Adenosins.

Bindet man daher den spacer zunächst an den Liganden, sind diese Schwierigkeiten zu umgehen. Die Beladung des

Gels mit Effektor wird höher, der spacer führt keine ionisierbaren Gruppen ein. Die Bindungsstelle im Liganden kann aufgrund der Synthese eindeutig festgelegt werden.

Im Falle des Adenosins stehen zur Anknüpfung des spacers der Adenin- oder der Riboseteil zur Auswahl. Die in Tabelle 1 zusammengestellten kinetischen Daten begründen die getroffene Entscheidung.

Tab. 1: Bindung und Umsetzung von Adenosinderivaten an Adenosin-aminohydrolase. (Cory und Suhadolnik; 1965).

	Rel. Geschw.	Inhibition %	K_s*)
Adenosin	1	0	---
N^6-Methyl-adenosin	0	80	$0{,}53 \cdot 10^{-5}$
9-Purin-ribonucleosid	0	78	$0{,}88 \cdot 10^{-5}$
9-(6-Mercaptopurin)-ribonucleosid	0	12	$33 \cdot 10^{-5}$
Adenin	0	0	∞
Adenosin-5'-monophosphat	0	0	∞

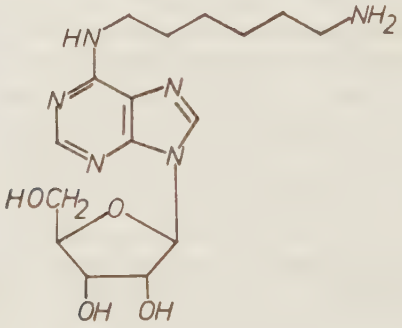
Cory und Suhadolnik (1965) zeigten, daß die Bindung von Adenosinderivaten an die Adenosin-aminohydrolase ganz offensichtlich über die Ribose erfolgt. Adenin z.B., dem ja die Ribose fehlt, wirkt weder als Substrat noch als Inhibitor. Im Purinteil veränderte Derivate sind dagegen starke Inhibitoren. Wirksame Effektoren für die Affinitätschromatographie sind also nur dann zu erwarten, wenn ihr Riboseteil unverändert bleibt, der spacer also an den

---

*) $K_s = \frac{[I] \cdot [E]}{[EI]}$ E = Enzym; I = Inhibitor; EI = Enzym-Inhibitor-Komplex

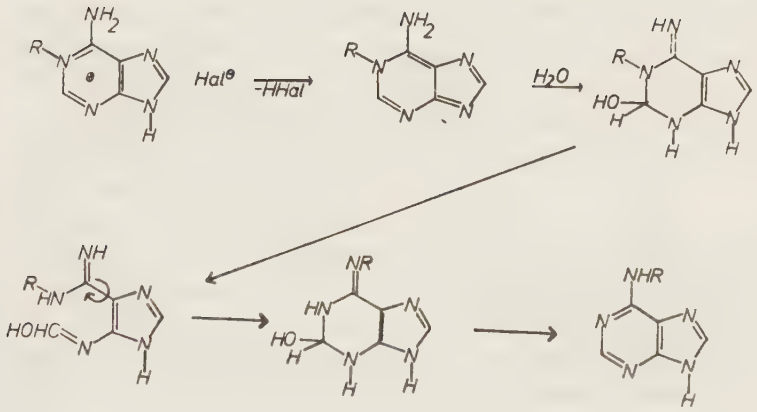
Adeninrest gebunden wird. Von den wenigen in Frage kommenden Positionen (C^2, C^8, N^6) bietet sich vor allem die letzte an, da eine Änderung an dieser Stelle manchmal Inhibitoren liefert, die fester als das Substrat an das Enzym gebunden werden.

Es stellte sich also die Aufgabe, im Adenosin die primäre Aminogruppe mit einem Alkylrest zu substituieren, der eine lineare Kette von sechs Kohlenstoffatomen aufweist und der am Ende die zur Bindung an die aktivierte Matrix erforderliche primäre Aminogruppe trägt, ein Adenosinderivat etwa folgender Formel:



2.1.2. Die Synthese von N^6-(6-Amino-2-hexenyl)-adenosin

Die Mesomerie mit dem Purinring zieht das freie Elektronenpaar der Aminogruppe teilweise in den Ring, so daß die direkte Alkylierung der Aminogruppe nur unter sehr drastischen Bedingungen und mit geringen Ausbeuten verläuft. Ein einfacher Weg zu N^6-substituierten Adeninderivaten führt aber über die Alkylierung des Stickstoffatoms 1 und anschließende Umlagerung des so entstandenen quartären Ammoniumsalzes in schwach alkalischer Lösung (Dimroth-Umlagerung). Die Reaktion verläuft über die folgenden Zwischenstufen (Lister; 1971):

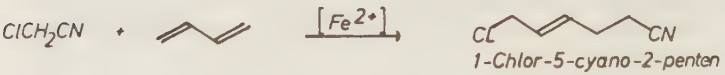


Diese Reaktion schien geeignet zur Anknüpfung des spacers an das Adenosinmolekül.

Wegen der geringen Nucleophilie des Purinringes sind zur Alkylierung nur sehr stark elektrophile Agentien wie z.B. Allylhalogenide befähigt, wodurch die Struktur der ersten drei Kohlenstoffatome also schon festgelegt ist. Weiterhin muß der spacer die zur Kopplung an die Matrix benötigte Aminogruppe tragen. Gleichzeitige Anwesenheit von nucleophilen und elektrophilen Gruppen in einem Molekül birgt jedoch die Möglichkeit der Reaktion dieser beiden Gruppen miteinander in sich, so daß die Aminogruppe zunächst in maskierter Form eingeführt werden muß, z.B. als Nitrilgruppe.

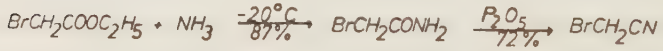
Die optimale Länge von sechs Kohlenstoffatomen ergibt sich bei Verwendung von folgendem Alkylierungsreagens:

Das Chlorderivat ist in der Literatur beschrieben (Moore e.a ; 1966), es entsteht aus Chloracetonitril und Butadien-1,3 unter der Katalyse von Fe^{2+}-Ionen:

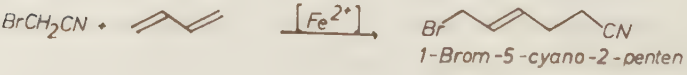


1-Chlor-5-cyano-2-penten

Es reagierte aber nicht mit Adenosin, so daß die reaktionsfähigere Bromverbindung hergestellt wurde. Das für die Synthese benötigte Bromacetonitril wurde der Vorschrift Steinkopfs (1905) folgend in zwei Schritten und mit 63-proz. Ausbeute aus Bromessigsäureäthylester über Bromessigsäureamid (Papendieck; 1892) erhalten:



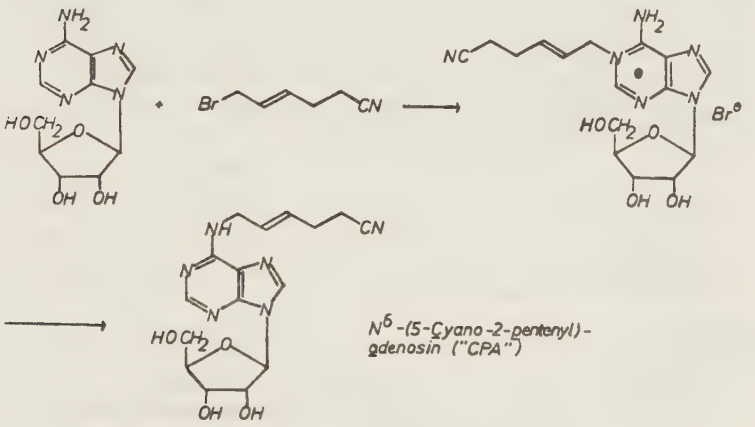
Äquimolare Mengen von Butadien-1,3 und Bromacetonitril, gelöst in Acetonitril und mit wasserfreiem Eisen(II)-chlorid versetzt, ließen nach 20-stündiger Reaktion bei 120 °C in einem innen vollständig mit Teflon ausgekleideten Stahldruckgefäß das gesuchte 1-Brom-5-cyano-2-penten in 37-proz. Ausbeute entstehen.



1-Brom-5-cyano-2-penten

Das so dargestellte reaktionsfähige Allylbromid wurde mit Adenosin in N,N-Dimethylformamid bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Nach 72 Stdn. wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, das zurückgebliebene rohe Ammoniumsalz in Wasser aufgenommen und umgelagert, indem die Lösung auf 95 °C erhitzt und der pH-Wert durch

Zufügen von 6N Natronlauge bei 7,5 konstant gehalten wurde. Das Produkt ließ sich aus dem Reaktionsansatz mit Essigsäureäthylester extrahieren, verunreinigt durch Ausgangsmaterial, das durch Chromatographie an Sephadex G-15 mit 0,05M Ammoniumcarbonatpuffer (pH = 7,5) als Elutionsmittel abgetrennt werden konnte. Aus Essigsäureäthylester kristallisierte analysenreines N^6-(5-Cyano-2-pentenyl)-adenosin.

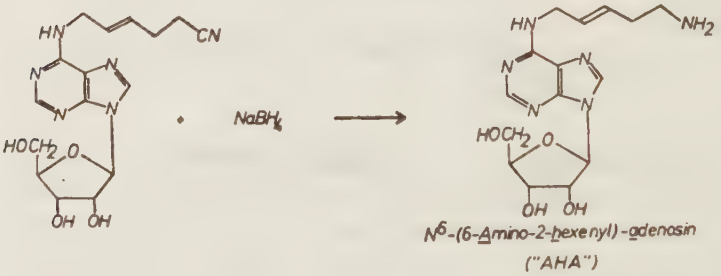


Die Ausbeute über beide Stufen betrug 39%.

Die Reduktion von Nitrilen zu primären Aminen verläuft einheitlich und mit hohen Ausbeuten nur bei Verwendung von komplexen Hydriden. Lithiumaluminiumhydrid kann aber nur in aprotischen unpolaren Lösungsmitteln verwendet werden, in denen das CPA nicht löslich ist. Natriumborhydrid löst sich unzersetzt in Wasser und Methanol, greift aber Nitrilgruppen nicht an. Satoh e.a. (1969) haben jedoch kürzlich Nitrile in Wasser und Methanol mit Natriumborhydrid in guten Ausbeuten in Amine übergeführt. Sie benutzten hierbei Übergangsmetallsalze als Katalysa-

toren, vorzugsweise Kobalt(II)-Salze.

Dieser Anregung folgend wurde das CPA in Methanol gelöst und mit der doppelten molaren Menge an Kobalt(II)-chlorid-hexahydrat versetzt. Unter Eiskühlung wurde portionsweise ein zehnfacher Überschuß an Natriumborhydrid zugesetzt und der Ansatz anschließend 16 Stdn. bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Hydrid wurde vorsichtig mit Salzsäure zersetzt und das Lösungsmittel verdampft. Chromatographie an Sephadex G-15 mit 0,05M Ammoniumcarbonatpuffer (pH = 7,5) als Elutionsmittel und zweimaliges Lyophilisieren der Gipfelfraktionen lieferte analysenreines N^6-(6-Amino-2-hexenyl)-adenosin.



N^6-(6-Amino-2-hexenyl)-adenosin
("AHA")

Die Ausbeute bei der Reduktion betrug 84%, bezogen auf eingesetztes Adenosin 33%.

2.1.3. Die kinetischen Konstanten des AHA

Im Gleichgewicht werden genau soviele Enzymmoleküle an den immobilisierten Effektor (Ligand) gebunden wie ihn verlassen,

$$E + L \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} EL$$

$$K_i = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E] \cdot [L]}{[EL]}$$

so daß sich als Quotient der Geschwindigkeitskonstanten die Dissoziationskonstante K_i des Enzym-Ligand-Komplexes ergibt.

Aus diesem Ausdruck lassen sich die Bedingungen für eine möglichst vollständige Bindung des Enzyms an den Liganden entnehmen.

1.) Sie wird um so vollständiger, je größer die Konzentration an Ligand und je geringer diejenige des Enzyms ist. Das bedeutet einerseits, daß man bestrebt sein muß, das Sorbens so hoch wie möglich mit Effektor zu beladen, andererseits bei steigender Enzymkonzentration ein immer kleinerer Anteil an den Liganden gebunden wird. Jedoch sind wegen der großen Molekulargewichte der Proteine die molaren Konzentrationen niemals so hoch, daß der Wert der Methode hierdurch entscheidend verringert werden würde.

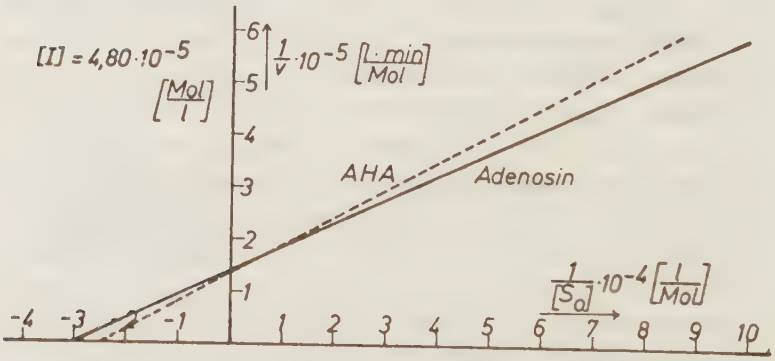
2.) Entscheidenden Einfluß hat die Dissoziationskonstante K_i. Steers e.a. (1971) fanden als Faustregel, daß ein Wert von $K_i > 0{,}5\text{-}1 \cdot 10^{-3}$ $[\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1}]$ ein nur wenig wirksames Affinitätssorbens liefert. Graves und Wu (1974) konnten diesen Wert in einer theoretischen Betrachtung bestätigen. Sie gingen allerdings von einem Modell aus, bei dem die Gleichgewichtseinstellung nur einmal erfolgt. Hiernach liegen bei $[L] = 10^{-2}$ $[\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1}]$ und $[E] = 10^{-5}$ $[\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1}]$ mehr als 90% des Enzyms als EL vor, wenn $K_i < 10^{-3}$ $[\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1}]$ ist. Größere Werte für K_i führen zu einer drastischen Abnahme des gebundenen Anteils, so daß der Wert $K_i = 10^{-3}$ $[\text{Mol} \cdot \text{l}^{-1}]$ als obere Grenze für ein Affinitätssorbens zu gelten hat, das wirksame Enzymanreicherungen bewerkstelligen soll.

Die Ablösung des gebundenen Enzyms wird - diesem Modell folgend - durch alle Maßnahmen erfolgen, die K_i vergrößern. Dies wird vor allem erreicht durch Änderung des

umgebenden Mediums, wie z.B. Änderung der Temperatur, des pH-Wertes oder der Ionenstärke. Für die ersten beiden Parameter sind durch die Proteinnatur der Enzyme Grenzen gesetzt. Erhöhung der Ionenstärke führt im Extremfall zur Ausfällung des Proteins, nicht aber zu seiner Denaturierung. So hat sich die Ablösung des spezifisch gebundenen Proteins durch Puffer hoher Ionenstärke als eine der am häufigsten verwendeten Methoden eingeführt.

Bei Säulenexperimenten mit Affinitätssorbentien stößt die Ermittlung von K_i und damit auch die Vorhersage ihrer Wirksamkeit auf Schwierigkeiten. Leicht zu ermitteln ist dagegen die Dissoziationskonstante K_s eines Enzyms und dessen gelösten Inhibitors. Abb. 1 zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm der von ADA katalysierten Reaktion in Gegenwart von AHA.

Abb. 1: Umsetzung von Adenosin durch ADA in Gegenwart und Abwesenheit von AHA.



Der Schnittpunkt auf der $\frac{1}{v}$-Achse weist AHA als kompetitiven Inhibitor der ADA aus. Die Michaeliskonstante der ungehemmten Reaktion wurde zu

$K_M = 3{,}23 \cdot 10^{-5}$ [Mol·l^{-1}]

gefunden, was in guter Übereinstimmung zu bisher berichteten Werten steht (Coddington; 1965). Für die gehemmte Reaktion ergaben sich:

$K_M' = 3{,}98 \cdot 10^{-5}$ [Mol·l^{-1}] $\quad K_s = 2{,}07 \cdot 10^{-4}$ [Mol·l^{-1}]

Der gefundene Wert für K_s scheint gerade an der Grenze, die noch ein wirksames Affinitätssorbens erwarten läßt, zu liegen. Folgende Einflüsse sind aber zu bedenken:

1.) Der K_s-Wert läßt keinen Schluß auf den Wert von K_i zu. Allen bisherigen Erfahrungen nach (Graves und Wu; 1974) ist K_i immer größer als K_s, manchmal bis zu drei Zehnerpotenzen. AHA scheint hiernach für die Affinitätschromatographie von ADA nicht geeignet.

2.) Die von Graves und Wu (1974) angegebene Grenze gilt für eine einmalige Einstellung des Bindungsgleichgewichts. Ein Säulenlauf bietet dem Gleichgewicht aber viele Male die Möglichkeit zur Einstellung, so daß auch bei großem K_s vielleicht noch gute Trennungen möglich sind.

Welcher der beiden Einflüsse überwiegt, mußte das Experiment zeigen.

2.1.4. Vorversuche

Die Erzeugung von Imidokohlensäureestergruppen ("Aktivierung") in Agarose erfolgte nach der erstmals von Axén e.a. (1967) angegebenen Vorschrift, indem Sepharose 4B*) in die wäßrige Lösung von Cyansäurebromid eingerührt und

*) Es wurde ausschließlich dieses Agarose-Präparat verwendet.

der pH-Wert solange mit 6N Natronlauge bei 11 konstant gehalten wurde, bis keine Lauge mehr aufgenommen wurde. Zur Vermeidung von Hydrolyse muß dieses aktivierte Gel sofort in die kalte Lösung des anzukoppelnden Amins eingebracht werden. Es reagiert am bereitwilligsten, wenn sein Elektronenpaar am Stickstoff nicht besetzt ist, bei pH-Werten also, die größer als 8-9 sind. Jedoch führt diese Reaktion zu einem Gleichgewicht, wodurch im Affinitätssorbens Imidokohlensäureestergruppen verbleiben und die zu trennenden Proteine kovalent über deren Aminogruppen binden würden. Daher ist es vonnöten, diese Gruppen mit einem hydrophilen, niedermolekularen Amin (z.B. 2-Aminoäthanol) zu blockieren.

Zur Ermittlung der Wirksamkeit so dargestellter Affinitätssorbentien sollte aus Gemischen von hochgereinigter ADA (spez.Akt. = 200 $\left[U \cdot mg^{-1}\right]$) mit anderen Proteinen das Enzym wieder isoliert werden. Als Begleitproteine wurden die Serumproteine ausgewählt, aufgeteilt in

1.) hochreines Albumin aus Rinderserum*),
2.) die in den Sättigungsgrenzen 10-50% mit Ammoniumsulfat ausfallenden Globuline aus Rattenserum.

Ersteres sollte als wohldefiniertes, einheitliches Begleitprotein die erhaltenen Ergebnisse eindeutig interpretierbar machen, letzteres stellte wegen des breiten Spektrums der in ihm enthaltenen Proteine wesentlich höhere Ansprüche an die Trennfähigkeit des Sorbens.

Die bei der Affinitätschromatographie an AHA-beladener Sepharose**) zu erwartenden Ergebnisse erlangen wesent-

---

*) Im folgenden mit "BSA" ("bovine serum albumine") bezeichnet.

**) Sepharose, die einen Liganden trägt, wird im folgenden nur durch die Benennung des betreffenden Aminrestes bezeichnet, z.B. AHA-Sepharose usw.

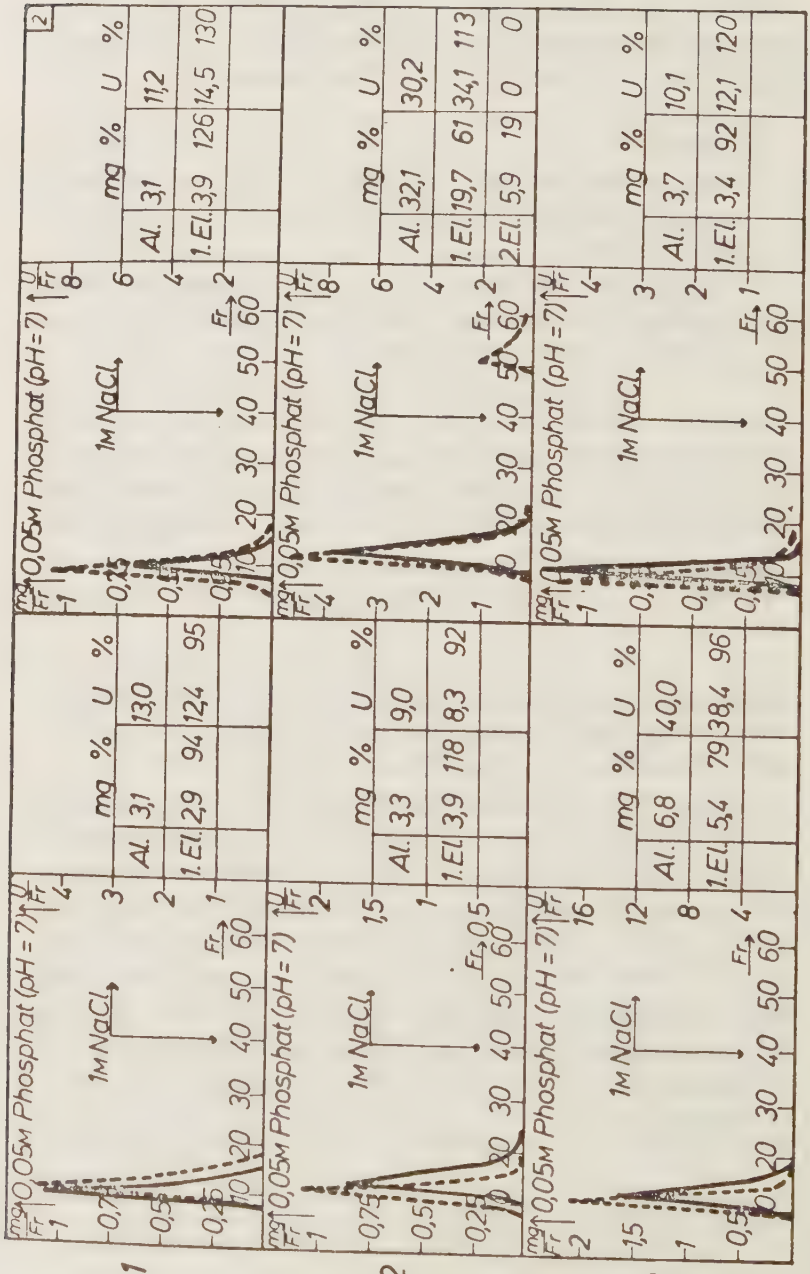
liche Aussagekraft im Vergleich mit Trennungen an Sorbentien, die noch nicht den spezifischen Liganden tragen. In Vorversuchen wurden daher zunächst die Gemische von ADA mit BSA bzw. der Globulinfraktion an

1.) Sepharose 4B,
2.) aktivierter Sepharose 4B, die 16 Stdn. in kalter 0,1M Natriumhydrogencarbonatlösung (pH = 9,1) gerührt hatte,
3.) aktivierter Sepharose 4B, die durch Reaktion in 1M 2-Aminoäthanollösung (pH = 8) mit ω-Hydroxyäthylgruppen beladen worden war,

chromatographiert. Die unter 2.) und 3.) angeführten Sorbentien wurden gewählt, um zu erfahren, ob im Gel verbliebene Imidokohlensäureestergruppen Proteine kovalent binden können und ob die in das Gel eingebrachten ω-Hydroxyäthylgruppen Proteine verzögern. Die Elutionsdiagramme dieser Versuchsreihe sind in Abb. 2 zusammengefaßt.

Weder auf unbehandelter noch auf ω-Hydroxyäthyl-Sepharose werden irgendwelche Proteine verzögert oder ganz zurückgehalten. Die Blockierung unbenutzter aktiver Gruppen durch 2-Aminoäthanol führt zu keinen Änderungen der Laufeigenschaften. Von aktivierter Sepharose wird ein Teil der Globulinfraktion zurückgehalten, der auch mit einer 1M Kochsalzlösung nicht vollständig eluiert werden konnte. Jedoch ist dies wahrscheinlich nicht auf die kovalente Bindung von Proteinen zurückzuführen, denn dann ist nicht einsichtig, warum nicht ADA bzw. BSA ebenfalls gebunden werden. Über dieses hartnäckige Haften verschiedener Proteine wird noch an anderer Stelle zu berichten sein.

Abb. 2: BSA/ADA (A) und Globuline/ADA (B) auf Sepharose 4B (1), aktivierter Sepharose 4B (2) und ε-Hydroxyäthyl-Sepharose (3). Legende s. Abb. 4.

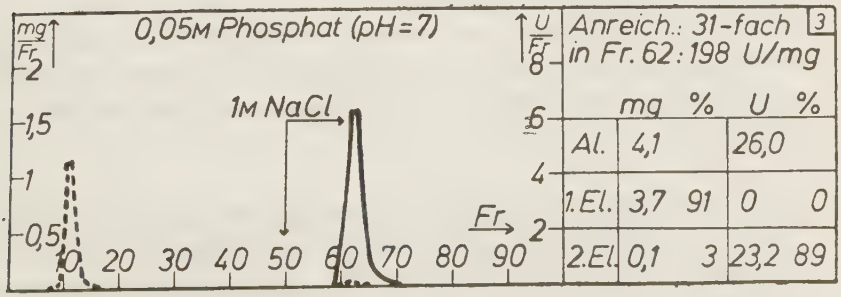


2.1.5. Vergleichsläufe an AHA-Sepharose

Zur Ankopplung des spezifischen Liganden wurde Sepharose 4B wie oben beschrieben aktiviert und in die Lösung von AHA in 0,1M Natriumhydrogencarbonatlösung (pH = 9,1) eingerührt. Nach 16 Stdn. wurde das Gel abfiltriert und nicht gebundenes AHA durch 1M Kochsalzlösung und Wasser ausgewaschen. Seine Konzentration in der Waschflüssigkeit wurde durch Messung der Extinktion bei λ = 267 nm (≙ ε_{max} von AHA) bestimmt. Differenzbildung mit der Einwaage lieferte die Konzentration an gebundenem Liganden. Sie betrug in typischen Experimenten ca. 5 µMol/ml Gel. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur in einer 1M 2-Aminoäthanollösung (pH = 8) wurde das Gel in dem zum Säulenlauf vorgesehenen Puffer aufgenommen, zur Säule gegossen und mit ca. fünf Säulenvolumina dieses Puffers äquilibriert.

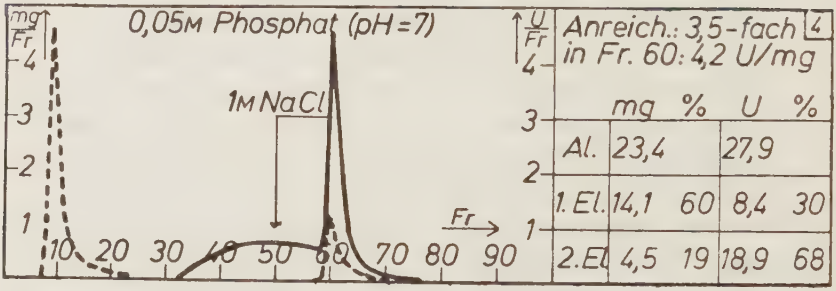
Auf derartige Säulen wurden die beschriebenen Testgemische von ADA mit BSA bzw. Globulinen aufgetragen und zunächst mit 0,05M Natriumphosphatpuffer (pH = 7) eluiert, dem später 1 Mol Kochsalz pro Liter zugesetzt wurde. Die Abb. 3 und 4 zeigen die Elutionsdiagramme dieser Versuche.

Abb. 3: BSA/ADA auf AHA-Sepharose



Legende s. Abb. 4.

Abb. 4: Globuline/ADA auf AHA-Sepharose



Fr. : Es wurden Fraktionen zu je 2 ml gesammelt.
Al. : Auftragslösung.
1. El. : Elution mit Laufpuffer allein.
2. El. : Elution mit Laufpuffer, der das über dem Pfeil im Diagramm angegebene Ablösereagens enthält.
Anreich.: Anreicherung.
-------- : Proteinkonzentration (Lowry e.a.; 1951).
———— : ADA-Aktivität (Bergmeyer e.a.; 1970).

Aus dem Gemisch mit Albumin eluierte der Auftragspuffer allein nur das Begleitprotein, während das spezifisch gebundene Enzym durch Zusatz von 1 Mol Kochsalz zum Auftragspuffer abgelöst werden konnte. Die erzielte Anreicherung (ausgedrückt als der Quotient der spezifischen Aktivitäten des eluierten und des aufgetragenen Proteins) stellt die maximal mögliche dar, das Enzym in Fraktion 62 hat die gleiche spez.Akt. wie die reine ADA. Das Affinitätssorbens arbeitet in diesem Fall ideal, Begleitprotein und Enzym werden deutlich voneinander getrennt und beide vollständig eluiert.

Aus dem Globulingemisch läßt sich die ADA nicht mehr so rein wiedergewinnen. Die Anreicherung im Gipfel der Aktivität ist 3,5-fach, das eluierte Protein enthält nur 2% ADA. Wie im Falle der aktivierten Sepharose (Abb. 2) eluierte der Auftragspuffer 60% des Begleitproteins, der Rest konnte auch durch 1M Kochsalzlösung nicht vollständig abgelöst werden.

Diese Beharrlichkeit, mit der Teile der Globulinfraktion am Affinitätsgel haften blieben, gab Anlaß zu versuchen, das Enzym anders als durch Erhöhung der Ionenstärke abzulösen. Könnte man spezifisch die Enzym-Ligand-Bindung spalten, verbliebe zwar das Begleitprotein immer noch auf dem Sorbens, jedoch würde ein reineres Enzym eluiert werden.

Graves und Wu (1974) diskutierten in ihrer theoretischen Betrachtung der Affinitätschromatographie auch die Elution mit einem gelösten Inhibitor I des abzulösenden Enzyms. Dabei wird sich dieses Gleichgewicht einstellen:

$$E + I \rightleftharpoons EI \qquad K_s = \frac{[E]\cdot[I]}{[EI]}$$

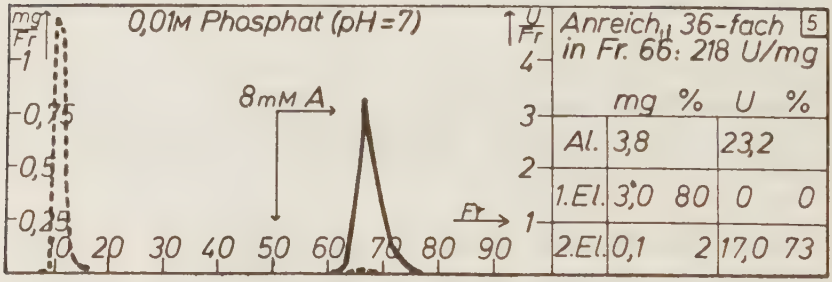
Das heißt, der gebundene und der gelöste Inhibitor werden um das Enzym konkurrieren. Die Autoren sagten voraus, daß bei $K_s = K_i$ und einer Ligandenkonzentration von $10^{-2}\ [Mol\cdot l^{-1}]$ das Enzym sich an den gelösten Inhibitor lagert, wenn dessen Konzentration größer als 0,1 $[Mol\cdot l^{-1}]$ ist. Geringere Konzentrationen werden benötigt, wenn $K_s < K_i$ ist. Diese Betrachtungen sollten natürlich auch Gültigkeit haben für den Fall des Substrats als Konkurrent des gebundenen Inhibitors.

Die Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes von ADA mit Adenosin ist experimentell schwer zugänglich. Als Meßgröße soll daher die Michaelis-Konstante K_M dienen. Sie ist gleich K_s, wenn die Abreaktion des Enzym-Substrat-Komplexes zum Produkt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.

Die Michaelis-Konstante für die ADA ist $3{,}5\cdot10^{-5}$ $[Mol\cdot l^{-1}]$ (Coddington; 1965). Die Voraussetzungen für eine Ablösung durch das Substrat sind also günstig. Eine 8mM (d.i. eine bei 4 °C gesättigte) Lösung von Adenosin im Auftragspuffer sollte das Enzym wieder ab-

lösen. Abb. 5 zeigt das Elutionsdiagramm dieses Versuchs mit BSA und ADA.

Abb. 5: BSA/ADA auf AHA-Sepharose; Elution mit 8mM Adenosinlösung.



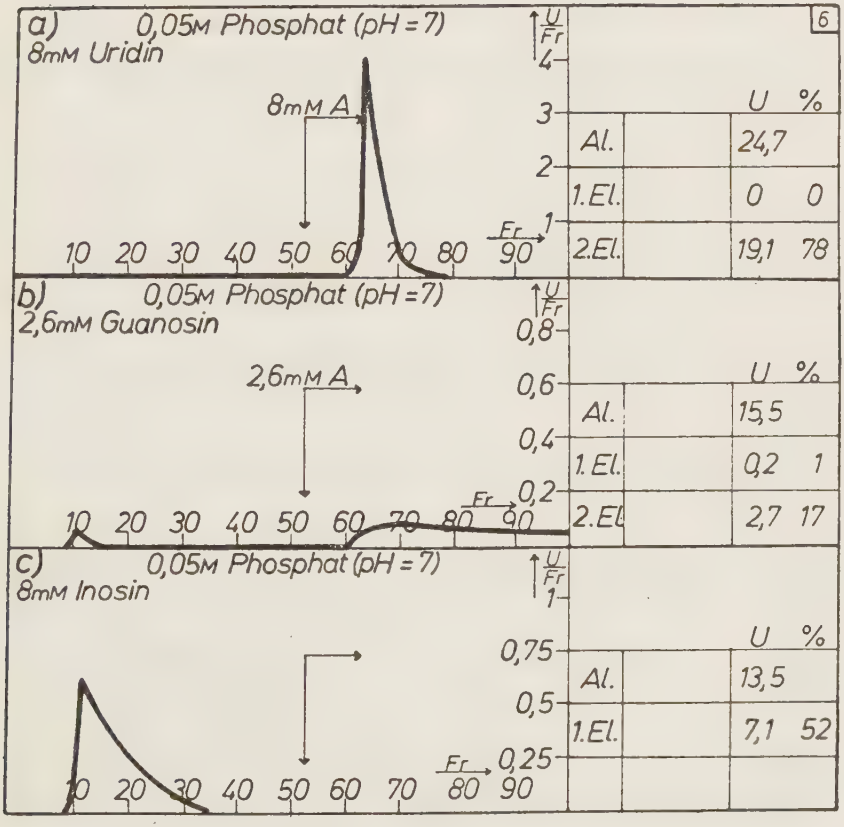
Auftragspuffer allein eluierte also wiederum das gesamte Albumin, während das reine Enzym durch Adenosinlösung abgelöst werden konnte. Das Adenosin wurde hierbei durch das Enzym vollständig zu Inosin hydrolisiert, wie durch Messung des UV-Spektrums im Eluat gezeigt werden konnte.

Zum Beweis dafür, daß die Elution auf einer spezifischen Wechselwirkung des Enzyms mit seinem Substrat beruhte, wurden Versuche durchgeführt, bei denen der Elutionspuffer andere Nucleoside enthielt. Die Elutionsdiagramme dieser Säulenläufe sind in Abb. 6 wiedergegeben.

Das Pyrimidinnucleosid Uridin eluierte, wie zu erwarten war, die ADA nicht. Diese wurde in der zweiten Elution von 8mM Adenosinlösung in gewohnter Weise abgelöst.

Das Purinnucleosid Guanosin ist nicht so gut löslich wie das Adenosin, so daß nur mit einer 2,6mM (d.i. eine bei 4 °C gesättigte) Lösung eluiert werden konnte. Die hierbei abgelöste Menge ADA ist nicht signifikant (1%). Adenosin in gleicher Konzentration wie Guanosin löste

Abb. 6: BSA/ADA auf AHA-Sepharose; Elution mit 8mM Uridin (a), 2,6mM Guanosin (b) und 8 mM Inosin (c).

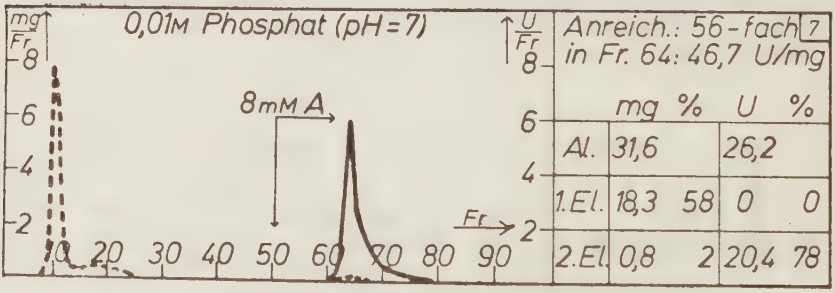


in zweiter Elution 17% des Enzyms ab. Hierbei traten exakt die von Graves und Wu (1974) vorhergesagten Verhältnisse ein. Bei kleiner werdenden Konzentration des konkurrierenden Inhibitors (im vorliegenden Fall das Substrat) nimmt die Menge spezifisch eluierten Enzyms ab, gleichzeitig erfolgt eine Verteilung der Aktivität über viele Fraktionen. Immerhin konnte auch in diesem Fall nur das spezifisch wirkende Adenosin eine Ablösung bewirken.

Das Produkt Inosin sollte die ADA ebenfalls ablösen, denn es wird ja auch an das Enzym gebunden. Die Tatsache, daß Inosin in gleicher Konzentration wie Adenosin nur 51% der ADA, verteilt über viele Fraktionen, ablöste, beweist, daß die Dissoziationskonstante des Enzym-Produkt-Komplexes größer ist als die des Enzym-Substrat-Komplexes.

Alle drei Versuche bewiesen aber die Vorteile der Adenosin-Elution. Die Kombination von spezifischer Bindung an den immobilisierten Liganden und spezifischer Elution sollte also ein sehr reines Enzym liefern. Abb. 7 zeigt das Elutionsdiagramm eines Trennversuchs von ADA und dem Globulingemisch, der unter diesen Bedingungen durchgeführt wurde.

Abb. 7: Globuline/ADA auf AHA-Sepharose; Adenosin-Elution.



Adenosin eluierte zwar ein wesentlich reineres Enzym als 1M Kochsalzlösung (56-fache Anreicherung gegenüber 3,5-facher bei Kochsalz), jedoch sind nur 23% des abgelösten Proteins aktive ADA, das Restprotein verließ trotz spezifischer Elution ebenfalls die Säule.

Dieser Versuch zeigte immerhin die große Überlegenheit der spezifischen Elution über die Erhöhung der Ionenstärke, jedoch verhinderte die Hartnäckigkeit, mit der

Teile der Globulinfraktion nach anderen Mechanismen an das Affinitätssorbens gebunden werden, die Wiedergewinnung völlig reiner ADA.

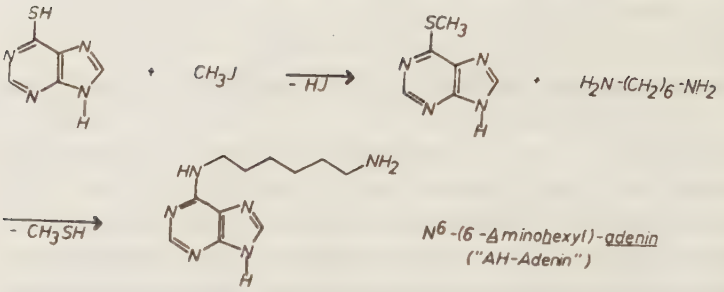
2.1.6. Versuche an mit unspezifischen Liganden beladener Agarose

Daher sollte jetzt herausgefunden werden, welcher spezielle Teil des Liganden die Fremdproteine bindet und nach welchem Mechanismus. Hierzu wurde der spezifische Ligand formal immer weiter verkürzt und an den so entstandenen Sorbentien die üblichen Proteingemische chromatographiert.

Formal wurde zuerst die Ribose abgespalten, d.h. es wurde ein Adeninderivat synthetisiert, das am N^6 die Sechserkohlenstoffkette mit der Aminogruppe an ihrem Ende trägt. N^6-substituierte Adenine lassen sich sehr einfach aus dem leicht zugänglichen 6-Mercaptopurin darstellen (Elion e.a.; 1952).

Dazu wurde 6-Mercaptopurin in alkalischer Lösung mit Methyljodid an der Mercaptogruppe methyliert und das in 71-proz. Ausbeute entstandene 6-Methylmercapto-purin im abgeschmolzenen Rohr bei 140 °C mit 1,6-Diaminohexan zur Reaktion gebracht. Das Diamin wurde in 14-fachem Überschuß zugegeben, um seine Disubstitution durch das Purinderivat so weit wie möglich zu unterdrücken. Nach dem Abkühlen wurde dem Ansatz überschüssiges Diamin mit Benzol entzogen. Das Produkt kristallisierte aus Essigsäureäthylester/ Acetonitril (50:50; v/v) in 77-proz. Ausbeute analysenrein aus.

Diese in beiden Schritten mit sehr hohen Ausbeuten verlaufende Reaktionsfolge ist der Synthese des AHA zweifellos überlegen. Jedoch verbietet sich ihre Anwendung auf Adenosin, einmal wegen der hohen Reaktionstemperatur im zweiten Schritt, zum anderen ist das benötigte 6-Mer-

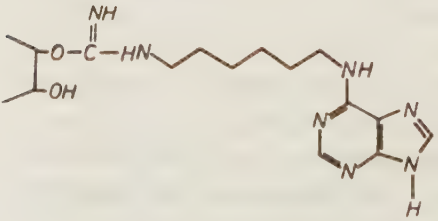


N^6-(6-Aminohexyl)-adenin
("AH-Adenin")

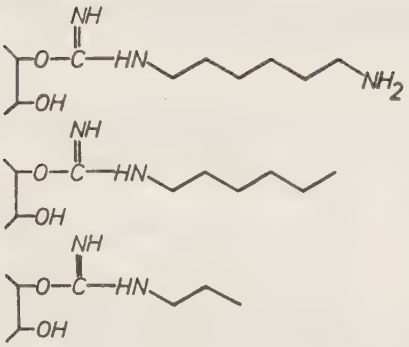
captopurin-ribonucleosid außerordentlich schwer zugänglich.

Das so dargestellte Adeninderivat trägt zwar nicht mehr die Doppelbindung in Position 2 der Seitenkette, jedoch ist es unwahrscheinlich, daß diese im AHA einen anderen Einfluß auf die zu trennenden Proteine ausübt als die übrige Kette. AH-Adenin wurde wie AHA an aktivierte Sepharose gebunden (typische Beladung: ca. 6 µMol/ml Gel).

Reaktion von aktivierter Sepharose mit einem großen Überschuß an 1,6-Diaminohexan lieferte ein Sorbens, das nur noch die Aminogruppe am spacer trug, nach Reaktion mit n-Hexylamin entstand nur noch mit spacer beladene Sepharose, durch Reaktion mit n-Propylamin schließlich ein Sorbens mit dreigliedrigem (also "halbiertem") spacer. Es stand also folgende Reihe von Sorbentien zur Verfügung:



AH-Adenin-Sepharose



ω-Aminohexyl-Sepharose

n-Hexyl-Sepharose

n-Propyl-Sepharose

Auf diese Sorbentien wurden die üblichen Proteingemische aufgetragen und in der ersten Elution mit 5 Säulenvolumina 0,05M Natriumphosphatpuffer (pH = 7) chromatographiert, dem in der zweiten Elution 1M Kochsalz zugegeben wurde. Die Elutionsdiagramme dieser Versuche sind in Abb. 8 und 9 wiedergegeben.

Von den vier Sorbentien binden die letzten drei sowohl die ADA als auch die Begleitproteine derart stark, daß sie mit Auftragspuffer allein nicht mehr eluiert werden. Selbst 1M Kochsalz vermochte weder Globuline noch ADA von n-Hexyl-Sepharose abzulösen und nur einen geringen Teil des BSA.

Allen hier untersuchten Sorbentien ist die hydrophobe Alkylkette gemeinsam. So werden die untersuchten Proteine am stärksten von dem längsten hydrophoben spacer gebunden. Wird er kürzer (n-Propyl-Sepharose), werden mit Kochsalz wieder beträchtliche Mengen ADA und auch Begleitprotein abgelöst. Weniger feste Bindung tritt ebenfalls ein, wenn der spacer durch eine hydrophile Endgruppe (Aminogruppe oder Adeninrest) abgeschlossen wird. Diese Versuchsreihe demonstrierte also augenfällig die große Bindungskapazität des hydrophoben spacers

Abb. 8: BSA/ADA auf AH-Adenin-Sepharose (a), auf ω-Aminohexyl-Sepharose (b), auf n-Hexyl-Sepharose (c) und auf n-Propyl-Sepharose (d).

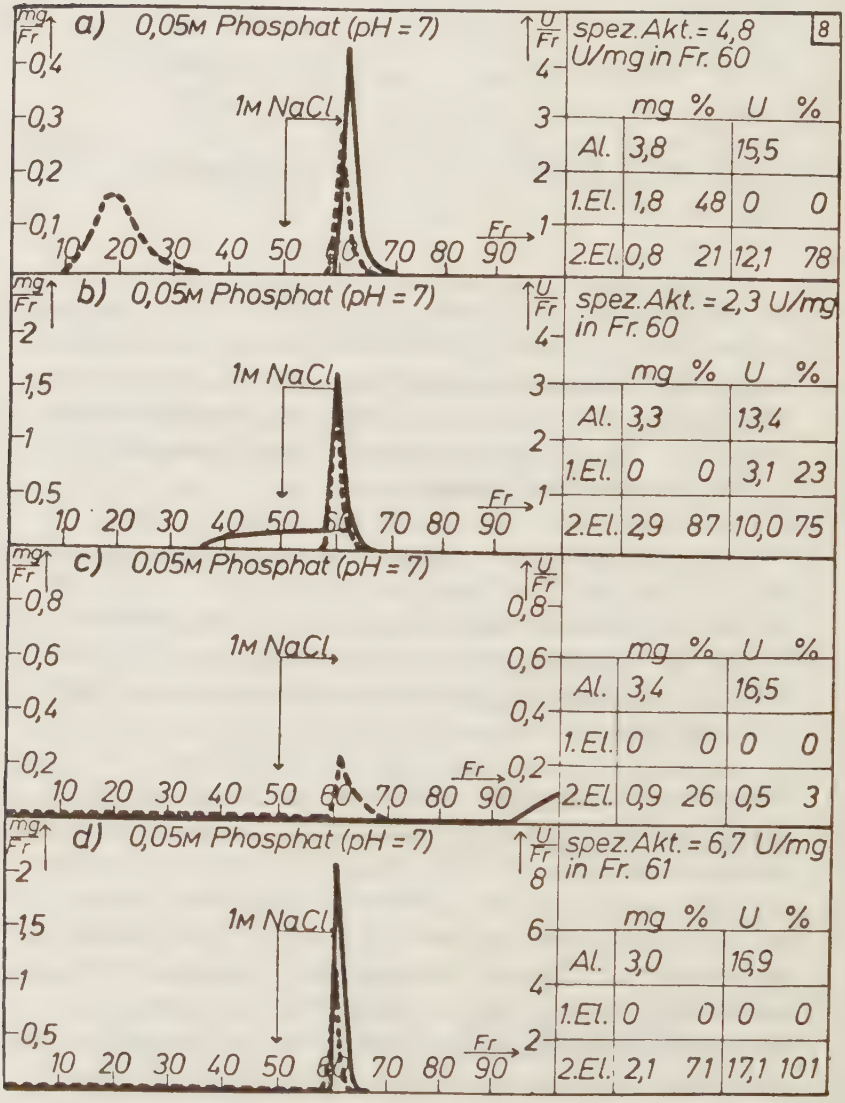
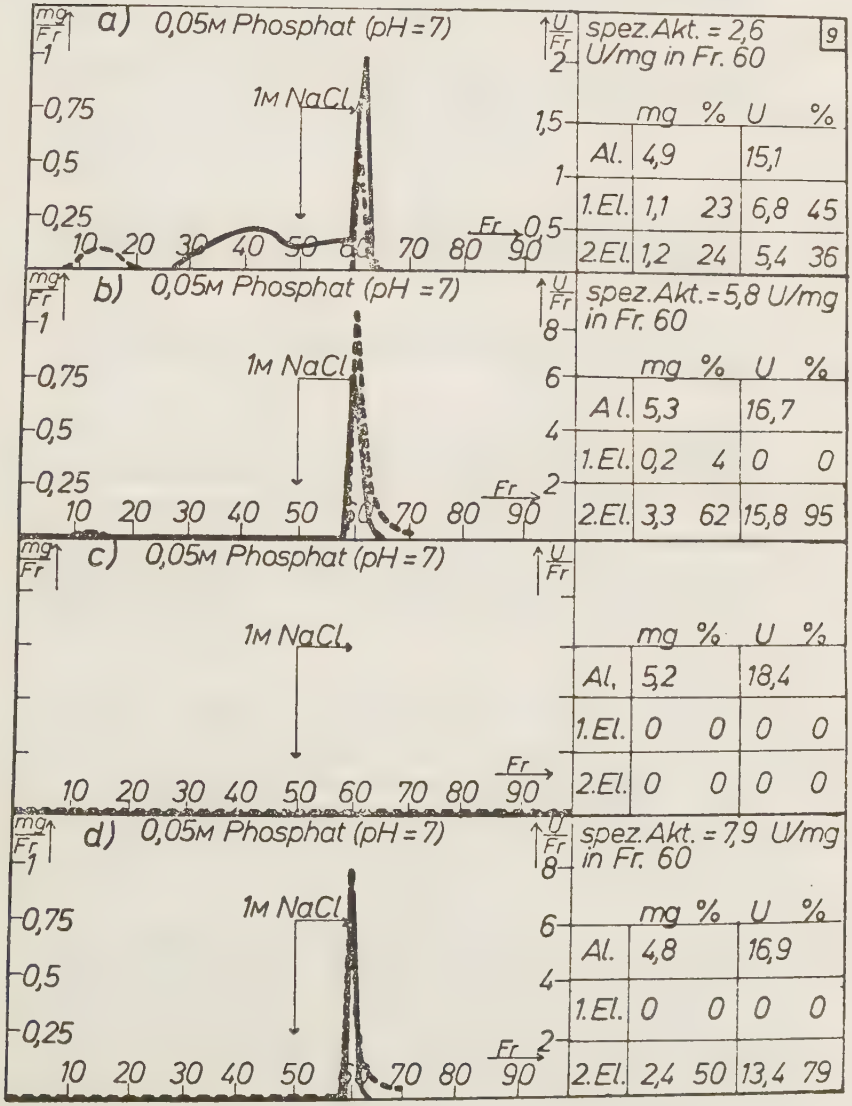


Abb. 9: Globuline/ADA auf AH-Adenin-Sepharose (a), auf ω-Aminohexyl-Sepharose (b), auf n-Hexyl-Sepharose (c) und auf n-Propyl-Sepharose (d).



aufgrund von Wechselwirkungen mit hydrophoben Bereichen in einer Vielzahl von Proteinen. Will man die Affinitätschromatographie möglichst einheitlich nur nach dem biospezifischen Erkennungsmechanismus ablaufen lassen, wird man in allererster Linie die hydrophoben Wirkungen des spacers zu unterdrücken haben.

2.2. Die Affinitätschromatographie mit N^6-(2,3-Dihydroxy-6-aminohexyl)-adenosin-Agarose

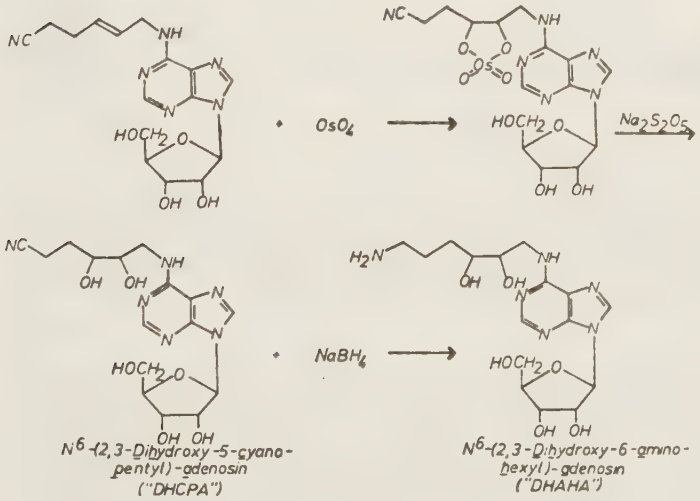
2.2.1. Die Synthese von N^6-(2,3-Dihydroxy-6-aminohexyl)-adenosin

Die Anknüpfung des spacers an das Adenosinmolekül erforderte ein Allylhalogenid, wodurch das AHA notwendigerweise eine Doppelbindung in der Seitenkette erhielt. Diese zunächst nutzlose, aber nicht störende, Doppelbindung bietet jetzt einen willkommenen Angriffspunkt, den spacer durch ihre Überführung in ein Glykol hydrophiler zu machen.

Die Synthese eines Glykols aus einem Olefin gelingt mit den höchsten Ausbeuten bei Verwendung von Osmium(VIII)-oxid. Die Hydroxylierung wurde auf der Nitrilstufe durchgeführt, um Störungen durch die Aminogruppe hintan zu halten. Die Lösung von CPA in wasserfreiem Dioxan rührte 24 Stdn. lang bei Raumtemperatur mit einem 5-proz. Überschuß an Osmium(VIII)-oxid. Der dann entstandene schwerlösliche braune Osmiumsäureester wurde abfiltriert und ohne Reinigung gespalten. Hierzu rührte er 2 Stdn. lang bei Raumtemperatur in der Lösung eines fünffachen Überschusses an Natriumdisulfit in Wasser/Pyridin (1:1; v/v). Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum und Aufnehmen des Rückstands in 0,05M Ammoniumcarbonatpuffer (pH = 7,5) wurde der Ansatz durch Chromatographie an

Sephadex G-15 in seine Komponenten zerlegt. Rechromatographie der Gipfelfraktionen lieferte ein reines Produkt, das aus wenig Wasser analysenrein auskristallisierte.

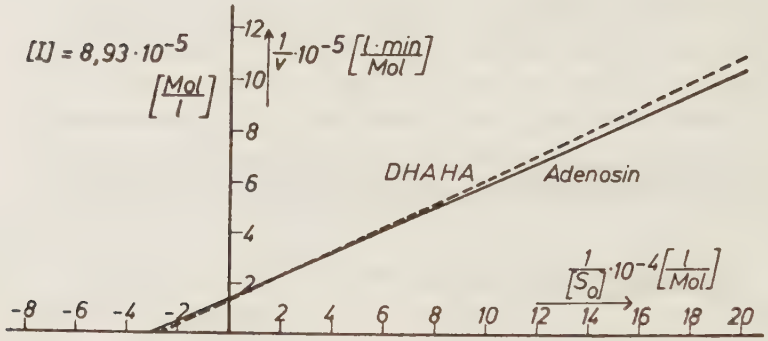
Die Ausbeute über beide Stufen bis zum Nitril betrug 67%. Die Reduktion zum Amin, die unter denselben Bedingungen wie beim CPA durchgeführt wurde, verlief mit 39-proz. Ausbeute, so daß also das N^6-(2,3-Dihydroxy-6-aminohexyl)-adenosin in einer Ausbeute von 26% aus N^6-(5-Cyano-2-pentenyl)-adenosin zugänglich ist.



Wie beim AHA wurde die Inhibitorkonstante ermittelt, Abb. 10 zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm der ADA-Reaktion in Gegenwart von DHAHA ($[I] = 8{,}93 \cdot 10^{-5}$ $[Mol \cdot l^{-1}]$). Für die durch DHAHA gehemmte Reaktion ergab sich:

$K_M' = 4{,}14 \cdot 10^{-5}\ [Mol \cdot l^{-1}]$ $\quad K_s = 3{,}15 \cdot 10^{-4}\ [Mol \cdot l^{-1}]$

Abb. 10: Umsetzung von Adenosin durch ADA in Gegenwart von DHAHA.



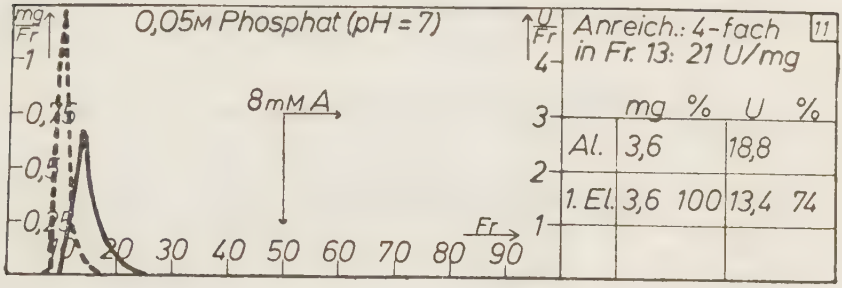
Die Substanz wurde, wie beim AHA beschrieben, an aktivierte Sepharose gebunden und unbenutzte aktivierte Gruppen mit 2-Aminoäthanol blockiert. Die Beladung mit immobilisiertem Ligand betrug in typischen Experimenten ca. 4 µMol/ml Gel.

Dieses Affinitätssorbens verspricht schlechtere Trennergebnisse. Einmal ist der K_i-Wert größer als der des AHA. Unter der Voraussetzung, daß dieser am gelösten Inhibitor gewonnene Parameter Schlüsse auf die Verhältnisse am immobilisierten zuläßt, ist mit einer weniger festen Bindung der ADA an dieses Sorbens zu rechnen. Zum anderen ist die Ligandenkonzentration im Gel geringer, was eine größere Konzentration an freiem Enzym im Bindungsgleichgewicht (s. 2.1.3.) erwarten läßt. Beide Einflüsse zielen also in die gleiche ungünstige Richtung. Das Experiment mußte erweisen, ob diese negativen Aspekte durch die größere Hydrophilie des spacers wettgemacht werden können.

2.2.2. Vergleichsläufe an DHAHA-Sepharose

Auf dem neuen Affinitätssorbens wurde das Gemisch von BSA und ADA unter den gleichen Bedingungen wie an AHA-Sepharose chromatographiert, Abb. 11 zeigt das Elutionsdiagramm dieses Versuchs.

Abb. 11: BSA/ADA an DHAHA-Sepharose.



Auftragspuffer allein eluierte zwar wie bei AHA-Sepharose das gesamte Begleitprotein, aber auch schon 74% des Enzyms, der Rest wurde mit 8mM Adenosinlösung abgelöst.

Die erwartete schwächere Bindung der ADA an das immobilisierte DHAHA trat also ein. Graves und Wu (1974) diskutierten die Trennung der spezifischen Bindung durch Vergrößerung von K_i bei höheren Ionenstärken. Daher sollte K_i mit geringerer Ionenstärke kleiner werden und die ADA an DHAHA-Sepharose gebunden bleiben, wenn mit 0,02M Natriumphosphatpuffer (pH = 7; J = 0,045) chromatographiert wird anstelle des bisher verwendeten 0,05M (pH = 7; J = 0,11). Die Elutionsdiagramme der unter diesen Bedingungen durchgeführten Säulenläufe mit den beiden üblichen Testgemischen an DHAHA-Sepharose zeigen die Abbildungen 12 und 13.

Abb. 12: BSA/ADA an DHAHA-Sepharose, J = 0,045.

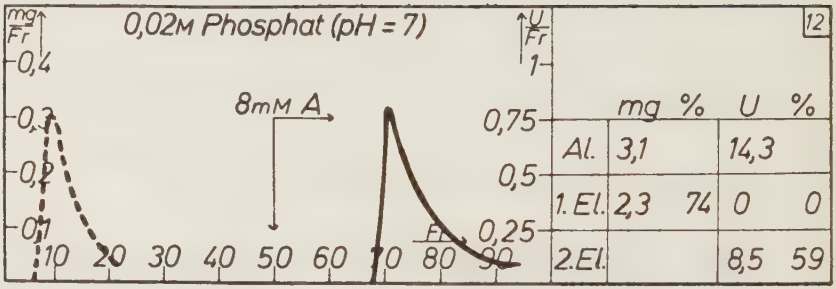
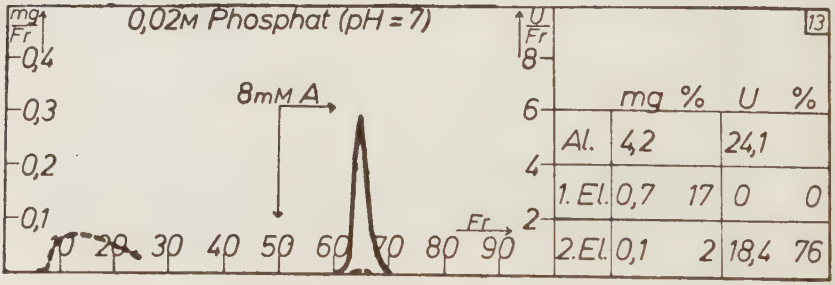


Abb. 13: Globuline/ADA an DHAHA-Sepharose, J = 0,045.

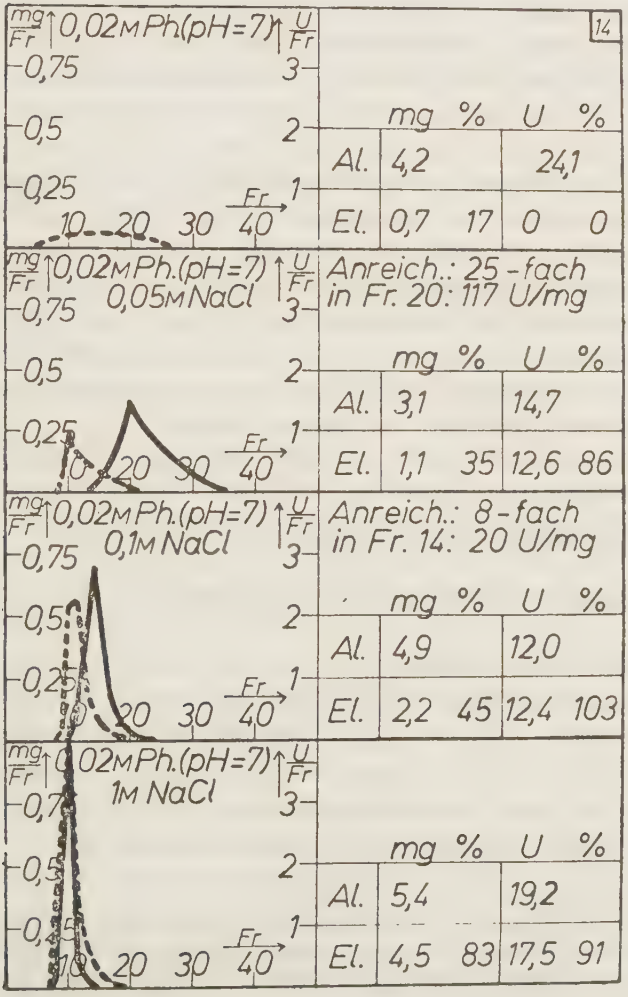


Auftragspuffer eluierte jetzt in keinem der beiden Fälle das Enzym, das BSA vollständig, aber nur 18% der Globuline. 8mM Adenosin löste in beiden Fällen die ADA vollständig ab. Aus dem Globulingemisch konnte zwar eine ähnlich große Anreicherung wie im entsprechenden Lauf an AHA-Sepharose erzielt, aber wiederum keine reine ADA eluiert werden.

Im wesentlichen wurden an diesem Sorbens also ähnliche Ergebnisse wie an AHA-Sepharose erhalten. Jedoch stärkte die Herabsetzung der Ionenstärke neben der spezifischen Bindung offensichtlich auch die unspezifischen. Einen augenfälligen Beweis hierfür lieferte eine Versuchsreihe, bei der die ADA im Gemisch mit den Globulinen an DHAHA-

Sepharose mit 0,02M Natriumphosphatpuffer (pH = 7), der steigende Mengen Kochsalz enthielt, chromatographiert wurde. Diese Elutionadiagramme sind in Abb. 14 wiedergegeben.

Abb. 14: Globuline/ADA an DHAHA-Sepharose; Elution mit steigenden Mengen an Kochsalz.



Je höher die Ionenstärke, in desto kürzeren Abständen voneinander wurden Begleitprotein und ADA eluiert. Gleichzeitig nahm die absolute wiedererhaltene Menge beider Komponenten zu, bis sie mit 1M Kochsalz beide vollständig und die Gipfel in einer Fraktion eluiert wurden.

Die Tatsache, daß 1M Kochsalz die Globuline vollständig von DHAHA-Sepharose ablöst, von AHA-Sepharose aber nur zu 79%, beweist, daß das neue Affinitätssorbens die hydrophoben Wechselwirkungen tatsächlich verringert. Jedoch wird dieser Vorteil mehr als aufgehoben. Der größere Wert von K_i gegenüber dem AHA und die geringere Beladung des Gels mit DHAHA verlangen für eine vergleichbar feste Bindung der ADA an das Affinitätssorbens eine geringere Ionenstärke im Laufpuffer, wodurch aber die unerwünschten nicht-spezifischen Bindungen ebenfalls gestärkt werden und das Sorbens somit mehr Fremdproteine bindet als AHA-Sepharose. Für die Isolierung der ADA aus biologischem Material verspricht DHAHA-Sepharose also schlechtere Ergebnisse als AHA-Sepharose.

2.3. Die Isolierung von ADA aus biologischem Material

2.3.1. ADA aus der Schleimhaut von Kälberdärmen

Als ergiebigstes Material für die Isolierung der ADA hat sich die Schleimhaut von Kälberdärmen erwiesen*). Neben der ADA findet sich vor allem die alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1; "AP") in großen Konzentrationen in der Mucosa, so daß ein Reinigungsverfahren der ADA notwendigerweise auch eine Abtrennung der AP beinhalten muß.

---

*) Hohe Aktivitäten an Adenosin-aminohydrolase konnten auch aus Taka-Diastase gewonnen und hoch angereichert werden (Sharpless und Wolfenden; 1967). Dieses Enzym besitzt jedoch eine völlig andere Spezifität als ADA aus tierischen Organen.

So waren z.B. Kalckars (1947) erste Reinigungsschritte zur Isolierung der ADA identisch mit den von Schmidt und Thannhauser (1943) angewendeten zur Darstellung der AP. Kalckar (1947) homogenisierte wie sie die Darmschleimhaut mit Wasser, emulgierte mit Toluol und ließ 36 Stdn. lang Trypsin bei 37 °C einwirken. Im Filtrat dieser Emulsion versuchte er, die ADA an Aluminiumhydroxydgel zu adsorbieren. Er macht keine Angaben über die Reinheit seines Enzyms, sagt lediglich, daß 35-40% der ADA in der Lösung verbleiben und das vom Aluminiumhydroxyd desorbierte Protein noch beträchtliche Aktivitäten an AP aufweist.

Coddingtons (1965) Anreicherungsverfahren verzichtet auf die Trypsinverdauung und setzt an ihre Stelle eine Hitzebehandlung. Die weitere Aufarbeitung sieht eine Ammoniumsulfatfällung und je zwei Chromatographien an Sephadex G-50 und DEAE-Cellulose vor. Alle diese Schritte reicherten die ADA 53-fach an, verliefen mit 30-proz. Ausbeute und lieferten ADA der spez.Akt. 22,9 $[U \cdot mg^{-1}]$.

Brady und O'Connell (1962) fanden heraus, daß die Trypsinbehandlung lediglich die Aktivität der AP um das fünffache steigert, nicht aber diejenige der ADA. Sie ließen daher diesen Schritt ebenfalls aus und isolierten ADA in einem siebenstufigen Verfahren, darunter vier Säulenchromatographien, aus acetongetrockneter Darmschleimhaut in 45-proz. Ausbeute mit einer spez.Akt. von 437 $[U \cdot mg^{-1}]$ (gemessen bei 37 °C) und einer Verunreinigung von 0,2% AP.

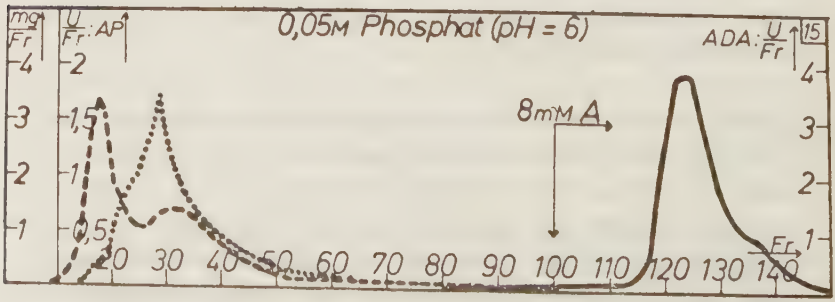
Diese wenigen Beispiele sollen den Rahmen liefern, in den die affinitätschromatographische Anreicherung der ADA, die jetzt versucht werden sollte, zu stellen ist. Es wurde bewußt das Isolierungsschema von Schmidt und Thannhauser (1943) in den ersten Schritten nachgearbeitet, um zu erfahren, in welchem Maße die Affinitätssor-

bentien in der Lage sind, die ADA möglichst hoch anzureichern und dabei von der AP zu trennen.

So wurde die Mucosa der ersten zwei Meter von zehn Kälberdünndärmen abgeschabt, mit Wasser verdünnt und mit Toluol emulgiert. Nach 36-stündiger Inkubation mit Trypsin bei 37 °C wurde die Emulsion durch eine Schicht Kieselgur filtriert, wobei sie sich klärte, und anschließend mit soviel Ammoniumsulfat versetzt, bis die Lösung zu 85% gesättigt war. Das ausgefallene Protein wurde abermals über Kieselgur filtriert, in 0,1M Ammoniumacetatpuffer (pH = 8,9) aufgenommen und eine geringe Verunreinigung an Kieselgur abzentrifugiert. Eine solcherart hergestellte Lösung verwendete Kalckar (1947) für seinen Trennversuch. Sie ist in ihrer Zusammensetzung ähnlich den von Coddington (1965) und Brady und O'Connell (1962) verwendeten. Sie enthielt 3,8 mg Protein, 3,4 U ADA und 1,3 U AP im ml. Die spezifischen Aktivitäten waren also 0,89 und 0,34 $[U \cdot mg^{-1}]$ für ADA bzw. AP.

20 ml dieser Lösung wurden an einer AHA-Sepharose-Säule (1,8 x 20 cm; V = 51 ml) mit 0,05M Natriumphosphatpuffer (pH = 6) chromatographiert. Abb. 15 zeigt das Elutionsdiagramm dieses Versuchs.

Abb. 15: Kälberdarmextrakt an AHA-Sepharose.



.....: alkalische Phosphatase

Acht Säulenvolumina Auftragspuffer allein eluierten 63% des eingesetzten Proteins, 112% der AP- und 3% der ADA-Aktivität, letztere erst in den allerletzten Fraktionen. Es war beabsichtigt, die Säule solange mit Auftragspuffer zu spülen, bis sie kein Protein mehr abgibt, in der Hoffnung, daß das Enzym spezifisch gebunden bleibt. Als jedoch im Eluat nennenswerte ADA-Aktivitäten erschienen, obwohl noch Begleitprotein eluiert wurde, wurden dem Puffer 8mM Adenosin pro Liter zugesetzt, das 72% der eingesetzten ADA-Aktivität ablöste. Die Gipfelfraktionen wurden vereinigt und zur Entfernung des Inosins dreimal gegen 0,02M Natriumphosphatpuffer (pH = 7) dialysiert. Das Dialysat hatte eine spez.Akt. von 48,7 $\left[U \cdot mg^{-1}\right]$, war also gegenüber der Auftragslösung 55-fach angereichert. Allerdings sind nur 23% des isolierten Proteins aktive ADA und 0,08% aktive AP. Die Daten dieses Anreicherungsverfahrens für ADA sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

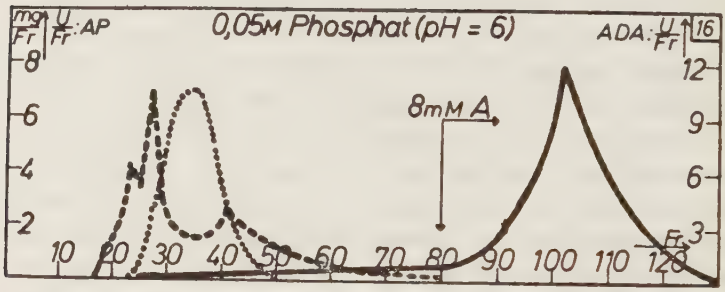
Tab. 2: Affinitätschromatographische Anreicherung der ADA aus Kälberdarmschleimhaut auf AHA-Sepharose.

	Adenosin-deaminase						alk.Phosphatase		
	Vol.	Prot.	Akt.		Anr.		Akt.		
	ml	mg	U	$\frac{U}{mg}$	%	-fach	U	$\frac{U}{mg}$	%
Filtrat	3250	16900	2841	0,17	100		878	0,053	100
AS-Lsg.	502	1920	1681	0,89	59	5,2	649	0,34	74
Al.	20	76,5	67,3	0,89	59	5,2	25,9	0,34	74
1. El.	400	47,9	2,4	0,05	2	0,3	28,9	0,6	82
2. El.	48	1,04	50,6	48,6	42	286	0,3	0,3	1

Immerhin konnte in einem einstufigen Verfahren auf einer im Verhältnis zum Volumen der Auftragslösung kleinen Säule aus einem rohen Darmschleimhautextrakt eine recht beträchtliche Anreicherung erzielt werden. Dieses Verfahren ist also - zumindest für die Vorreinigung der ADA - allen bisher beschriebenen weit überlegen.

Den gleichen Versuch mit einer DHAHA-Sepharose-Säule (1,6 x 26 cm; V = 52 ml) mit 40 ml Auftragslösung zeigt Abb. 16.

Abb. 16: Kälberdarmschleimhautextrakt an DHAHA-Sepharose.



Auftragspuffer allein (6Säulenvolumina) eluierte 60% des eingesetzten Proteins, 13% der ADA- und 161% der AP-Aktivität*). 8 mMol Adenosin im Auftragspuffer lösten 89% der eingesetzten ADA-Aktivität ab. Das Dialysat der vereinigten Gipfelfraktionen wies eine spezifische ADA-Aktivität von 24,5 $[U \cdot mg^{-1}]$ auf, das Enzym ist also 17-fach angereichert worden. Tab. 3 gibt Auskunft über die Daten dieses Anreicherungsversuchs.

Tab. 3: Affinitätschromatographische Anreicherung der ADA aus Kälberdarmschleimhaut an DHAHA-Sepharose.

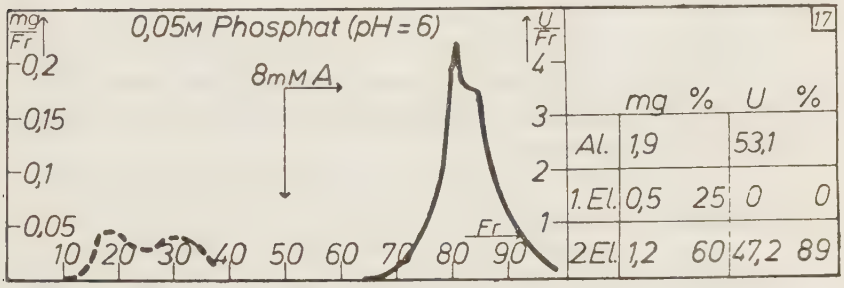
	Adenosin-deaminase						alk.Phosphatase		
	Vol. ml	Prot. mg	Akt. U	$\frac{U}{mg}$	%	Anr. -fach	Akt. U	$\frac{U}{mg}$	%
Al.	40	156	219	1,41	100		52,8	0,34	100
1. El.	320	94,0	28,3	0,30	13	0,2	85,2	0,91	161
2. El.	95	8,0	195	24,5	89	17,4			

*) Dieser Wert für die AP-Aktivität liegt außerhalb der Fehlergrenzen. Die einzig mögliche Erklärung ist, daß beim Test der Al. ein Fehler gemacht worden ist.

Die ADA wurde von diesem Sorbens weniger fest geburden als von AHA-Sepharose. Einmal erscheint sie wesentlich eher im Eluat als im vorhergehenden Versuch, zum anderen erreichte ihre Aktivität schon nach sechs Säulenvolumina derart hohe Werte, daß schon mit Adenosin eluiert wurde, als noch beträchtliche Mengen Fremdprotein die Säule verließen.

Die geringe spez.Akt. des eluierten Proteins gab Anlaß, die dialysierte Lösung der 2. Elution auf dem Affinitätssorbens zu rechromatographieren. Das Enzym in der Auftragslösung hatte eine spez.Akt. von 27,4 $[U \cdot mg^{-1}]$*). Abb. 17 zeigt das Elutionsdiagramm dieses Versuchs.

Abb. 17: Rechromatographie einer 2. Elution von Kälberdarmschleimhautextrakt an DHAHA-Sepharose.



Auftragspuffer allein eluierte 25% des eingesetzten Proteins, das mit Adenosin abgelöste Enzym hatte eine spez. Akt. von 24,8 $[U \cdot mg^{-1}]$, weniger also als die Auftragslösung.

Diese Tatsache, zusammen mit der Beobachtung, daß mit Auftragspuffer schon ein Teil Fremdprotein, aber keine Aktivität eluiert wurde, läßt sich nur deuten durch die Annahme, daß ein Teil des Enzyms während der Chromatographie oder der Dialyse denaturiert worden ist. Wiederum wurde bei der spezifischen Elution ein großer Teil in-

*) Das Dialysat stammt aus einem unter identischen Bedingungen durchgeführten Versuch an DHAHA-Sepharose.

aktiven Proteins abgelöst. Hierdurch wird die Annahme nahegelegt, daß schon die Auftragslösung, also auch der Kälberdarmschleimhautextrakt, einen Teil denaturierte ADA enthält, die also ihre katalytische Fähigkeit verloren hat, wohl aber noch an den immobilisierten Inhibitor angelagert werden kann. Schlüssig beweisen läßt sich diese Annahme allerdings nicht.

DHAHA-Sepharose lieferte also insgesamt gesehen ein schlechteres Trennergebnis als AHA-Sepharose. Der hydrophilere Ligand hält Fremdproteine im gleichen Maß fest, bindet andererseits jedoch das Enzym weniger stark, so daß nur ein sehr unreines Enzym eluiert werden kann, will man nicht große Verluste an ADA durch ausgiebiges Spülen der Säule mit Auftragspuffer in Kauf nehmen.

Dieser Befund sollte aber noch nicht verallgemeinert werden. Andere Organe könnten mit Proteinmustern ausgestattet sein, die fest an hydrophobe spacer gebunden werden, wobei dann der hydrophile seine Wirksamkeit voll zur Geltung brächte.

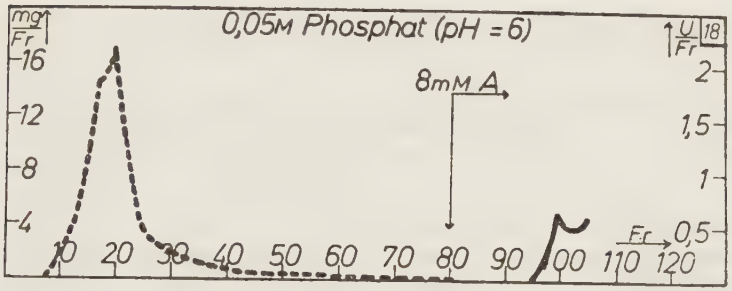
2.3.2. ADA aus Rattenleber

Wegen der großen Synthese- und Abbauleistung der Leber stellt dieses Organ ein ergiebiges Material für die Isolierung sehr vieler Enzyme dar. Die Aktivität der ADA ist in der Leber zwar nur gering, jedoch könnte gerade die hierbei erforderliche hohe Trennleistung der Affinitätssorbentien ihre Wirksamkeit augenscheinlich machen. So sollte versucht werden, ADA aus Rattenleberhomogenaten zu isolieren.

Die Lebern von 10 Ratten wurden mit dem fünffachen Volumen an 0,01M Phosphatpuffer (pH = 7), der $0{,}25 \cdot 10^{-3}$M Dithioerythrit im Liter enthielt, im Homogenisator nach Potter-Elvehejm homogenisiert und 1 Stunde bei 11700xg

zentrifugiert. Das in den Sättigungsgrenzen 50-70% mit Ammoniumsulfat ausfallende Protein wurde, gelöst in 0,02M Natriumphosphatpuffer (pH = 7), als Ausgangsmaterial verwendet. Es enthielt 9,2 mg Protein und 0,35 U ADA im ml, die spez.Akt. war also $3{,}8 \cdot 10^{-2}$ $[U \cdot mg^{-1}]$. 20 ml wurden an AHA-Sepharose chromatographiert, das Elutionsdiagramm dieses Versuchs ist in Abb. 18 wiedergegeben.

Abb. 18: Rattenleberhomogenat an AHA-Sepharose

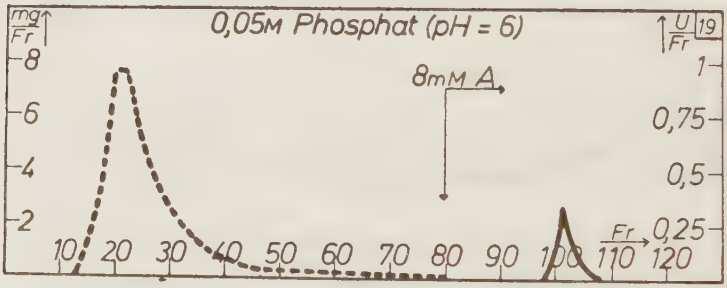


Sechs Säulenvolumina Auftragspuffer eluierten 97% des eingesetzten Proteins, keine ADA. Bei der Chromatographie des Darmschleimhautextrakts hatte sich gezeigt, daß bis zur Fraktion 80 (≙ 320 ml) keine ADA die Säule verläßt (s. Abb. 15). Da aber bei der geringen Menge an aufgetragener ADA (6,9 U) die Gefahr bestand, daß diese beim ausgiebigen Spülen mit Puffer allein vollständig eluiert wird, wurde schon jetzt die spezifische Elution mit 8 mMol Adenosin im Laufpuffer angeschlossen, wobei 51% der eingesetzten ADA-Aktivität abgelöst wurden. Zum Aktivitätstest mußten allerdings, wegen der geringen Enzymmenge, große Aliquots der einzelnen Fraktionen eingesetzt werden, wobei das in ihnen enthaltene Inosin durch seine Absorption die erhaltenen Werte unzuverlässig, bzw. ab Fraktion 100 einen Test völlig unmöglich macht. Die dialysierten Gipfelfraktionen ent-

hielten ADA der spez.Akt. 1,8 $[U \cdot mg^{-1}]$. Zwar wurde das Enzym bei diesem Säulenlauf gegenüber der Auftragslösung 47-fach angereichert, jedoch besteht das eluierte Protein nur zum hundertsten Teil aus aktiver ADA.

An DHAHA-Sepharose wurde ein anderes, aber auch nach dem oben beschriebenen Verfahren hergestelltes, Rattenleberhomogenat chromatographiert. Es enthielt 6,1 mg Protein und 0,17 U ADA der spez.Akt. $2{,}8 \cdot 10^{-2}$ $[U \cdot mg^{-1}]$ im ml. Das Elutionsdiagramm von 20 ml dieser Lösung an DHAHA-Sepharose zeigt Abb. 19.

Abb. 19: Rattenleberhomogenat an DHAHA-Sepharose.



Sechs Säulenvolumina Auftragspuffer eluierten 76% des eingesetzten Proteins, aber keine ADA. Mit 8 mMol Adenosin im Auftragspuffer wurden 32% der ADA-Aktivität abgelöst, der Test begegnete den gleichen Schwierigkeiten wie beim vorhergehenden Säulenlauf. Das Protein im Dialysat der vereinigten Gipfelfraktionen hatte eine spez.Akt. von 0,33 $[U \cdot mg^{-1}]$, was einer 12-fachen Anreicherung entspricht.

Die bei der Affinitätschromatographie des Darmschleimhautextrakts gemachten Erfahrungen setzten sich bei der Isolierung der ADA aus Rattenleber also fort. Wiederum zeigte AHA-Sepharose das bessere Ergebnis, ohne daß allerdings auch nur einigermaßen reine ADA isoliert werden konnte.

3. Diskussion

Der einfache Gedanke, einen Effektor eines Enzyms durch kovalente Bindung an ein Polymer unlöslich zu machen und einer mit diesem Affinitätssorbens im Gleichgewicht stehenden Proteinlösung nur dasjenige Enzym zu entziehen, das der Effektor spezifisch bindet, begegnet in seiner praktischen Ausführung Schwierigkeiten.

Seit man in Agarose ein geeignetes Trägermaterial und in ihrer Umsetzung mit Cyansäurebromid eine brauchbare Reaktion zur Erzeugung ausreichend reaktiver Gruppen zur Anknüpfung des spezifischen Liganden gefunden hatte, hat diese Methode in den letzten Jahren einen stürmischen Aufschwung erlebt. Bei der Erstellung neuer affinitätschromatographischer Systeme orientierte man sich nur am Erfolg, ohne nach den bei der jeweiligen Chromatographie tatsächlich wirksamen Mechanismen zu fragen. Die Festigkeit, mit der Enzyme Substrate bzw. Inhibitoren binden, schien der einzig relevante Parameter zu sein, andere Effekte keine Bedeutung zu haben. Die Leistungsfähigkeit eines affinitätschromatographischen Systems wurde nur an der erzielten Anreicherung des gesuchten Enzyms gemessen und es fällt auf, daß nur sehr selten Bilanzen über die eingesetzten und wiedererhaltenen Proteinmengen aufgestellt wurden. Jedoch ist die vollständige Elution sämtlichen Proteins ein außerordentlich wichtiger Gesichtspunkt für die Wiederverwendbarkeit von Affinitätssorbentien. Diesem Umstand wurde anfangs kaum Beachtung geschenkt. Erst in jüngster Zeit begann man, nach Nebenwirkungen zu fragen und zusätzliche Mechanismen bei der Affinitätschromatographie in die Diskussion einzubeziehen. Im folgenden soll versucht werden, diese zusätzliche Wirkungen abzuschätzen und in Beziehung zum biospezifischen Erkennungsmechanismus zu setzen. Ausgangspunkt ist das allgemein verwendete Modell, das im Affinitätssorbens die drei Be-

reiche Matrix, spacer und spezifischer Ligand unterscheidet,

Die Agarose stellt ein großräumiges Maschenwerk dar, das Makromoleküle nach deren Größe sortiert. Die Ausschlußgrenze liegt bei einem Molekulargewicht von ca. $50 \cdot 10^6$. Die hier behandelten Proteine sind aber sehr viel kleiner, können also ungehindert in die Poren eindringen und sollten alle mit dem gleichen Volumen eluiert werden. Die Matrix verhält sich also völlig inert gegenüber Proteinen.

Da die chemische Natur der Reaktionsprodukte von aktivierter Sepharose mit primären Aminen noch nicht endgültig aufgeklärt ist, bzw. die Reaktion uneinheitlich verläuft, ist eine Abschätzung der von der Anknüpfungsstelle ausgehenden Wirkungen schwierig. Untersuchungen an Modellsubstanzen (Axén und Vretblad; 1971) sowie Isoelektrofokussierungen (Svensson; 1973) gaben der Isoharnstoffstruktur die größte Wahrscheinlichkeit, obwohl sie von den drei vorgeschlagenen, nämlich Imidocarbonat-, Urethan- und Isoharnstoffstruktur, die reaktivste ist. Nun sind Isoharnstoffe Basen, deren pK_s-Werte sich in der Größenordnung basischer Gruppen in Proteinen bewegen (Zief und Edsall; 1937), so daß also das Protonierungsgleichgewicht

im hier ausschließlich interessierenden physiologischen pH-Bereich weit auf der rechten Seite liegt. Dadurch erhält das Affinitätssorbens eine zusätzliche Ionentauschfunktion. Inwieweit dieser Effekt nicht zur Geltung kommt, weil sich Proteine aus sterischen Gründen nicht in eine zur Ausbildung der Ionenbindung hinreichende Entfernung annähern können oder ob andere Effekte des Sorbens stärker sind, ist schwer zu beurteilen.

Einen Anhaltspunkt für die Beantwortung dieser Frage liefert das chromatographische Verhalten der hier untersuchten Standardproteine an ω-Hydroxyäthyl-Sepharose. Bei pH = 7 wird der Isoharnstoff eine Ionenbindung zumindest mit allen Proteinen eingehen, die am Neutralpunkt eine negative Überschußladung tragen, deren isoelektrischer Punkt also deutlich kleiner als 7 ist. Das trifft zu für BSA und ADA, die beide einen IP von 4,9 aufweisen, aber auch für einen Teil der Globulinfraktion. Aber diese Proteine wurden schon durch Puffer geringer Ionenstärke eluiert. Wenn auch der Chemismus der Ankopplungsreaktion noch nicht aufgeklärt ist, läßt sich doch sagen, daß die Anknüpfungsstelle des spacers keinen Einfluß auf die zu trennenden Proteine nimmt.

Die Versuche an ω-Aminohexyl-, n-Hexyl- und n-Propyl-Sepharose, an Sorbentien also, die nur den spacer tragen, zeigen dessen ausgeprägte Wirkung. Alle drei Sorbentien banden sowohl die ADA als auch die Serumproteine derart fest, daß sie mit Puffer allein nicht mehr abgelöst werden konnten. Selbst 1M Kochsalzlösung vermochte weder Globuline noch ADA von n-Hexyl-Sepharose abzulösen und nur einen geringen Teil des BSA. Von allen in dieser Arbeit beschriebenen Sorbentien band das nicht biospezifisch wirkende Sorbens n-Hexyl-Sepharose die ADA am festesten, wesentlich stärker als die biospezifischen Gele AHA- und DHAHA-Sepharose.

Eine unpolare Alkylkette vermag nur mit ebenfalls unpolaren Bereichen in Proteinen in Wechselwirkung zu treten. Je mehr polare Gruppen ein Protein in seiner Oberfläche besitzt, desto besser löslich ist es in Wasser. Deutliche Unterschiede in der Löslichkeit finden sich bei den Serumproteinen. Die schon bei geringen Konzentrationen an Ammoniumsulfat aus wäßriger Lösung ausfallenden Globuline wurden von allen drei mit Alkylresten beladenen Sorbentien so stark gebunden, daß sie mit

Puffer nicht, mit 1M Kochsalzlösung ebenfalls nicht oder nur sehr unvollständig eluiert wurden. Im Vergleich hierzu ist die Bindung des erst bei sehr hoher Konzentration an Ammoniumsulfat ausfallenden Serumalbumins und auch der ADA wesentlich schwächer. Dieses Verhalten quantitativ zu beschreiben, ist schwierig. Als Faustregel ergibt sich, daß ein Protein um so fester an mit Alkylresten beladene Sorbentien gebunden wird, je schwerer es in Wasser löslich ist.

Zwar sollte die Aminogruppe der ω-Aminohexyl-Sepharose zusätzlich zum hydrophoben Effekt der Alkylkette einen Ionentausch bewirken - die Aminogruppe liegt bei dem angewendeten pH = 7 weitgehend protoniert vor -, jedoch ist dieser Effekt offensichtlich nicht der dominierende. BSA liegt bei pH = 7 als Anion vor und sollte zusätzlich von den positiven Gruppen des Sorbens gebunden werden. Man sollte erwarten, daß die doppelte Bindung durch die Ionenbeziehung und den hydrophoben Effekt die Eluierbarkeit herabsetzt. Im Gegensatz zur Chromatographie an n-Hexyl-Sepharose erscheint BSA aber bei der Elution mit Kochsalz im Eluat. Die Aminogruppe schwächt also die Bindung. Dagegen liegt ein Teil der Globuline bei pH = 7 als Kation vor, sollte also von den geladenen Gruppen abgestoßen werden und schon ohne Kochsalz im Eluat erscheinen, wäre nicht der hydrophobe Effekt stärker.

Diese Ergebnisse an mit Alkylketten beladener Sepharose finden ihre vollständige Parallele in den von Er-el e.a. (1972) an n-Alkyl-Sepharose, von Shaltiel und Er-el (1973) an ω-Aminoalkyl-Sepharose sowie von Hofstee (1973) an Phenylbutyl-Sepharose gewonnenen Ergebnissen. Diese Autoren führten für derartige Trennverfahren an Sorbentien, die mit Alkylresten beladen sind, den Namen "hydrophobe Chromatographie" ein. Shaltiel und seine Mitarbeiter fanden, daß die Haftung von Proteinen an ihren Sorbentien mit wachsender Kettenlänge des Alkyl-

restes zunimmt, so daß im Extremfall Enzyme nur unter denaturierenden Bedingungen abgelöst werden konnten. Eine Aminogruppe schwächte ihren Beobachtungen nach die Bindung wieder, so daß, um gleich starke Bindung an Alkyl- und ω-Aminoalkyl-Sepharose zu erreichen, die Kette im letzteren Fall um ca. zwei Kohlenstoffatome länger sein muß. Hofstee (1973) chromatographierte BSA und γ-Globulin an seinem Sorbens und fand, daß 1M Kochsalzlösung einen Teil des BSA, nicht aber das γ-Globulin ablöste. In beiden Fällen findet sich also völlig gleiches Elutionsverhalten wie bei den hier durchgeführten Versuchen.

Große Beachtung verdient im Hinblick auf den bei der Bindung wirksam werdenden Mechanismus das Elutionsverhalten. Hydrophobe Bindungen sollten durch Erniedrigung der Dielektrizitätskonstanten des umgebenden Mediums, z.B. durch Beimengung von organischen Lösungsmitteln, geschwächt werden. So konnte Hofstee (1973) eine Proteinablösung durch Beimengung von 50% (v/v) Äthylenglykol zum Laufpuffer eine Elution des gebundenen Proteins bewirken. Jedoch ist mit der Beimengung organischer Lösungsmittel die Gefahr der Denaturierung von Enzymen verbunden. Die Aufhebung der hydrophoben Bindung durch hohe Ionenstärke scheint ein Widerspruch zu sein. Durch die hiermit einhergehende Erhöhung der Dielektrizitätskonstanten sollte sie eher gefestigt werden. Shaltiel (1974) interpretierte die Eluierbarkeit durch eine Konformationsänderung des gebundenen Proteins. Hohe Ionenstärken sollen Ionenbindungen in Proteinen aufheben, wodurch nach einer Konformationsänderung die hydrophoben Bereiche nicht mehr so leicht zugänglich sind. O'Carra e.a. (1974b) machten für die Absorption von Proteinen an Alkylketten van der Waalssche Kräfte oder elektrostatische Beziehungen nichtionischer Art verantwortlich, die durch hohe Ionenstärken gelöst werden.

Der Schluß, der aus all diesen Beobachtungen zu ziehen ist, muß also lauten:

Die unpolare Alkylkette, die den spezifischen Liganden in Distanz von der Matrixoberfläche halten soll, verfügt selbst über eine außerordentlich starke Bindungskapazität für Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen. Diese können geschwächt werden durch:
1.) hohe Ionenstärke des umgebenden Mediums;
2.) eine hydrophile Endgruppe der Alkylkette.

Der Ligand ist der exponierteste Teil des Affinitätssorbens. Zusätzliche - außer den biospezifischen - Wechselwirkungen sollten vor allem von ihm ausgehen. So konnten Rood und Wilkinson (1974) nicht entscheiden, ob bei ihrer Chromatographie an einem ionisierbaren Liganden die Trennung auf dem biospezifischen Effekt oder Ionentausch beruhte. Das Elutionsverhalten bei verschiedenen pH-Werten deutete mehr auf den letzteren Mechanismus.

Die Aktivierungstechnik von Sepharose mit Cyansäurebromid ermöglicht Ligandenkonzentrationen bis 10 µMol/ml Gel. Die in dieser Arbeit erzielten Beladungen sind etwas kleiner, was seine Ursache darin hat, daß zur Umsetzung von aktivierter Sepharose mit den Adenosinderivaten wegen deren schwierigen Darstellung niemals große Überschüsse verwendet wurden. Dieser Wert geht ein in das Dissoziationsgleichgewicht

$$E + I \rightleftharpoons EI \qquad K_i = \frac{[E]\cdot[I]}{[EI]}$$

Der Anteil Enzym, der als EI vorliegt, steigt mit zunehmender Konzentration an gebundenem Effektor I. In sehr starkem Maß wird die Konzentration an gebundenem Enzym und damit die Wirksamkeit des Affinitätssorbens jedoch durch den Wert von K_i beeinflußt. Je kleiner K_i ist, desto fester wird das Enzym gebunden. Graves und Wu

(1974) gaben den Grenzwert, bis zu dem ein Affinitätssorbens noch befriedigende Trennungen erlaubt, mit $K_i = 10^{-3} [Mol \cdot l^{-1}]$ bei dem maximal möglichen $[I]$ an. Die hier ermittelten Werte für AHA und DHAHA sind zwar um nicht ganz eine Zehnerpotenz kleiner, jedoch handelt es sich um K_s-Werte, d.h. sie sind am gelösten Inhibitor gewonnen worden. Obige Autoren fanden aber, daß K_i immer größer als K_s ist. Somit war es fraglich, ob AHA- bzw. DHAHA-Sepharose eine ausreichend feste Bindung der ADA bewirken würden.

Tatsächlich band das Sorbens mit dem kleineren K_i-Wert, AHA-Sepharose, die ADA noch ausreichend fest. Aus dem Gemisch mit nur einem Begleitprotein ließ sie sich einwandfrei und völlig rein wieder isolieren. In dem Maß, wie die Belastung mit Fremdprotein zunahm, wurde ein immer unreineres Enzym wiedergewonnen. Es waren die Begleitprotein- und Aktivitätsgipfel aber immer noch sehr deutlich voneinander getrennt und es konnten Anreicherungen erzielt werden, die mit den bisher eingeführten Proteintrennungsverfahren nur ganz selten erreicht werden. Zur Darstellung eines schon recht reinen ADA-Präparats aus rohem Kälberdarmschleimhautextrakt stellt das hier beschriebene affinitätschromatographische Verfahren eine wesentliche Vereinfachung dar. Die Gewinnung völlig reiner ADA scheiterte daran, daß das Sorbens gewisse Fremdproteine ebenfalls recht stark band und auch nach Elution der Hauptmenge immer noch im Verhältnis zum reinen Enzymprotein recht beträchtliche Mengen an Fremdprotein die Säule verließen.

Der K_i-Wert von DHAHA war bereits so groß, daß, um noch eine ausreichend feste Bindung der ADA an mit diesem Adenosinderivat beladener Sepharose zu erreichen, die Ionenstärke des Laufpuffers herabgesetzt werden mußte. Zwar konnte aus dem Gemisch mit BSA ebenfalls eine vollständige Trennung erreicht und völlig reine ADA wiedergewonnen werden, jedoch zeigte bei größerer Belastung

mit Fremdprotein dieses Sorbens durchweg schlechtere Ergebnisse als AHA-Sepharose.

In diesem Zusammenhang wäre ein Vergleich mit dem von Barry und O'Carra (1973a) dargestellten Affinitätssorbens mit einem immobilisierten Thioanalogen des Adenosins interessant. Die Autoren gingen zur Darstellung dieses Sorbens von -Aminohexyl-Sepharose aus, die nach Reaktion mit O-Bromacetyl-N-hydroxy-succinimid 6-Mercaptopurin-ribonucleosid über die Mercaptogruppe band. Die durch eine Säureamidgruppe unterbrochene Alkylkette des spacers sollte sich in ihrer Hydrophilie etwa zwischen den entsprechenden Seitenketten des AHA und des DHAHA einordnen. Da jedoch nur Enzym-Glucose-Gemische chromatographiert wurden, sind Aussagen über die Wirkungen von Fremdproteinen auf die Trennleistung nicht zu entnehmen. Über die Festigkeit der spezifischen Bindung kann ebenfalls nichts gesagt werden, da K_i nicht angegeben ist. Die von Barry und O'Carra (1973a) angewendete Methode hat im übrigen den auf S.6 diskutierten Nachteil und geht zudem von einem schwer zugänglichen Adenosinanalogen aus.

Auch die Lösung der spezifischen Bindung verdient größte Beachtung. Grundsätzlich wird sie erreicht durch alle Maßnahmen, die K_i vergrößern, also Änderung des pH-Wertes, der Temperatur, der Zusammensetzung und der Ionenstärke des umgebenden Mediums. Die überwiegende Zahl der in den ersten Jahren beschriebenen Systeme bediente sich dieser Möglichkeiten, vor allem der Erhöhung der Ionenstärke. Jedoch ist dies nur erlaubt, wenn gewährleistet ist, daß schon sämtliches Fremdprotein eluiert ist, sonst ist nur ein sehr unreines Enzym zu isolieren. Wenn man aber das Enzym schon spezifisch bindet, erscheint es wesentlich sinnvoller, es auch wieder spezifisch abzulösen, durch einen gelösten Effektor also, der mit dem immobilisierten um das Enzym konkurriert. Das Enzym wird sich aus zwei Gründen bevorzugt an den gelösten Effektor lagern und somit vom Sorbens getrennt:

1.) Das Substrat oder zumindest der gebundene Effektor besitzt in Lösung einen K_s-Wert, der kleiner als K_i ist. Daher wird sich das Enzym bevorzugt an den gelösten Effektor lagern.

2.) Die maximale Konzentration des gelösten freien Effektors ist meist höher als die des immobilisierten im Gel.

Der Angriffspunkt des gelösten Effektors ist die gleiche Stelle, an der das Enzym an den immobilisierten gebunden ist. Daher ist die Eluierbarkeit mit Substrat oder Inhibitor ein strenges Kriterium für das Vorliegen von Affinitätschromatographie. Unter diesem Gesichtspunkt sind die Versuche mit ADA an AHA- und DHAHA-Sepharose unter diesen Terminus einzuordnen.

O'Carra e.a. (1974b) widersprechen der Auffassung, die spezifische Bindung sei durch hohe Ionenstärke lösbar. Diese nähme nur selten Einfluß auf die Enzymkinetik und sollte daher auch die spezifische Bindung intakt lassen. Wenn aber bei der hydrophoben Chromatographie die Proteinkonformation durch Auflösen von Ionenbeziehungen mittels hohen Salzkonzentrationen derart geändert wird, daß hydrophobe Bezirke jetzt nicht mehr so leicht zugänglich sind, ist nicht einsichtig, daß hierdurch nicht auch die Konformation des Aktivzentrums so geändert wird, daß es den Inhibitor nicht mehr bindet. Eluierbarkeit des gebundenen Enzyms mittels hohen Salzkonzentrationen schließt die Affinitätschromatographie also nicht aus.

Es ergibt sich also folgender Schluß:

Da die Konzentration an gebundenem Liganden durch das Aktivierungsverfahren eine Konstante ist, wird die Wirksamkeit von Affinitätssorbentien nur durch den Wert von K_i bestimmt. Die Erfahrungen mit den Sorben-

tien AHA- und DHAHA-Sepharose und den K_s-Werten der betreffenden Effektoren führen zu der Schätzung, daß erst ein Wert $K_s \leq 10^{-5}$ $[Mol \cdot l^{-1}]$ ein Sorbens liefert, welches das betreffende Enzym so fest bindet, daß die Parameter des umgebenden Mediums in weiten Grenzen veränderbar sind und somit unerwünschte Nebenwirkungen weitgehend unterdrückt werden können. Das Enzym muß mit Substrat oder Inhibitor, kann mit hohen Ionenstärken eluiert werden, damit das System den Namen "Affinitätschromatographie" verdient.

Grundsätzlich ergibt sich bei jedem Affinitätssorbens, das nach dem Modell Matrix-spacer-Ligand aufgebaut ist, die Konkurrenz zwischen der spezifischen Bindung, die der Ligand vermittelt, und der hydrophoben Bindung, die von der Alkylkette ausgeht. Ionenbindungen werden in signifikantem Ausmaß wahrscheinlich nur wirksam, wenn der Ligand eine ionisierbare Gruppe enthält. Die möglicherweise von der Anknüpfungsstelle ausgehende Ionenbindung wird - wie die Versuche an ω-Hydroxyäthyl-Sepharose zeigten - zweifellos von den anderen Effekten dominiert. Da in der vorliegenden Arbeit mit einem im physiologischen pH-Bereich ungeladenen Liganden gearbeitet wurde, soll hier nur auf die Konkurrenz zwischen hydrophober und biospezifischer Bindung eingegangen werden.

Die reine hydrophobe Chromatographie soll dabei außer Acht gelassen werden. Weder ist die Bindung noch die Elution so gezielt wie bei der Affinitätschromatographie, so daß große Enzymanreicherungen mehr oder weniger Zufall sind. Die dann aber noch verbleibende Bandbreite der Systeme mit einem spezifischen Liganden mögen diese beiden Beispiele verdeutlichen.

1.) Trayer e.a. (1974) chromatographierten Lactat-dehydrogenase (EC 1.1.1.27) an immobilisiertem $NAD^{\oplus}$.

Das Enzym konnte nicht durch Puffer, der 0,5M Kaliumchlorid im Liter enthielt, abgelöst werden, wohl aber durch 1mM NAD®-Lösung.

2.) Steers e.a. (1971) chromatographierten ß-Galactosidase (EC 3.2.1.23) an immobilisiertem p-Aminophenyl-ß-D-thiogalactopyranosid. Obwohl dieser Inhibitor den außerordentlich großen Wert von $K_s = 5 \cdot 10^{-3}$ $[Mol \cdot l^{-1}]$ aufweist, vermochte 50mM Lactoselösung das Enzym nicht abzulösen.

Im ersten Fall ist strengste Biospezifität erreicht worden, die nur noch durch das Cosubstrat aufgehoben werden konnte. Im zweiten Fall ist zu fragen, ob überhaupt noch von Biospezifität die Rede sein darf.

Der Teil des Sorbens, der die Ergebnisse der Affinitätschromatographie unübersichtlich macht und ihre Wirksamkeit einschränkt, ist der spacer. Es gibt zwei Auswege.

Unterbricht man die lange Alkylkette durch hydrophile Gruppen, können Proteine nicht mehr hydrophob gebunden werden. In allen vergleichbaren Versuchen an AHA- und DHAHA-Sepharose, die unter gleichen äußeren Bedingungen durchgeführt wurden, zeigte sich, daß das hydrophilere Sorbens die hier untersuchten Testproteine weniger fest band. Allerdings war auch die Bindung der ADA weniger fest, was auf dem größeren Wert für K_s des DHAHA beruhte.

Es sei noch einmal an die Versuche von Cuatrecasas (1970) erinnert, der eine um so festere Bindung des betreffenden Enzyms an seine Sorbentien erreichte, je länger der spacer war und hieraus den sterisch ungehinderten Zugang des Enzyms postulierte. Jedoch laufen seine Trennergebnisse völlig parallel mit den von Shaltiel und Er-el (1973) an ω-Aminoalkyl-Sepharose erhaltenen. O'Carra e.a. (1974a) banden NAD® über spacer, in denen zumindest

jedes zweite Glied eine hydrophile Gruppe war, an aktivierte Sepharose und fanden keinen signifikanten Unterschied in der Festigkeit der Bindung verschiedener Dehydrogenasen, wenn der spacer drei bzw. sechs Kohlenstoffatome lang war. Sie schlossen hieraus, daß der Auffassung, der Ligand müsse durch einen genügend langen spacer sterisch ungehindert zugänglich sein, keineswegs eine derart grundlegende Bedeutung zukommt, wie bisher angenommen.

Will man also ein affinitätschromatographisches System erstellen und verfügt über einen Effektor mit einem sehr kleinen Wert für K_s, so ist in jedem Fall ein hydrophiler spacer zu verwenden, der wahrscheinlich nicht so lang zu sein braucht, wie bisher angenommen.

Beim Vergleich der kinetischen Konstanten von AHA und DHAHA zeigte sich, daß ersteres der stärkere Inhibitor der ADA ist. Bei sonst gleicher chemischer Konstitution deutet dies daraufhin, daß die ADA einen Bindungsort für die Alkylkette aufweist, der von der hydrophilen Seitenkette des DHAHA nicht besetzt werden kann. Dieses Verhalten fand seine Bestätigung in der Chromatographie an den beiden immobilisierten Effektoren. Die Bindung der ADA an AHA-Sepharose bewirkt ohne Zweifel hauptsächlich der spezifische Ligand - dies wird bewiesen durch die Möglichkeit der Elution des Enzyms mit Substrat -, jedoch trägt der hydrophobe spacer einen Teil zur Bindung bei.

Es scheint, als ob es sich im Fall der Chromatographie an AHA-Sepharose nicht im strengen Sinn um Affinitätschromatographie handelt, sondern um die von Barry und O'Carra (1973b) mit "compound affinity" bezeichnete Methode. Dieses Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß man bei schwachen Inhibitoren durch genau definierte äußere Bedingungen bewußt einen Teil der Bindungskapa-

zität des hydrophoben spacers zur Bindung des Enzyms ausnutzt, ohne daß der hydrophobe Effekt überwiegt. Dadurch wird das Enzym ähnlich fest wie bei reiner Affinitätschromatographie gebunden, Substrat oder Inhibitor eluieren auch dann ein reines Enzym, wodurch gleichzeitig die Dominanz des biospezifischen Mechanismus bewiesen wird. Die Versuchsbedingungen müssen bei jedem System empirisch gefunden werden und sind dann nur für dieses eine Problem gültig. Das System versagt vielleicht schon, wenn dasselbe Enzym aus einem anderen biologischen Material isoliert werden soll. Die Erfolge der compound affinity können niemals so groß sein wie die der Affinitätschromatographie. Die compound affinity sollte wirklich nur dann angewendet werden, wenn die zwar immer noch zu erreichende hohe Trennleistung den immensen Aufwand lohnt oder sich ein Enzym auf keine der herkömmlichen Methoden befriedigend anreichern läßt.

Verfügt man jedoch nur über einen schwachen Inhibitor, so ist die compound affinity der einzig gangbare Weg. Versuche, geringere Bindung von Fremdprotein durch einen hydrophilen spacer zu erreichen, werden bei der compound affinity aber immer mit einer weniger festen Bindung auch des Enzyms einhergehen und sind deshalb bei diesem Verfahren aussichtslos. Dieses würde auch dem Wesen der compound affinity widersprechen; ein hydrophiler spacer verschiebt den Bindungsmechanismus zur reinen Affinitätschromatographie. Eher erscheint es gerechtfertigt, die Länge des hydrophoben spacers zu ändern, um denjenigen Kompromiß herauszufinden, bei dem eine noch ausreichend feste Bindung des Enzyms mit einer noch vertretbaren Belastung durch Begleitprotein einhergeht.

4. Zusammenfassung

Die Entwicklung von Sorbentien zur Affinitätschromatographie von Adenosin-aminohydrolase (EC 3.5.4.4) wird beschrieben, die Einflüsse der Struktur von Ligand und spacer, der Elutionsbedingungen und der Begleitstoffe auf die Trennleistung untersucht und hiernach allgemeine Aussagen über die Leistungsfähigkeit der Methode getroffen.

Es wurde zunächst ein Adenosinderivat synthetisiert, das an der Aminogruppe eine Alkylkette trägt, die den Liganden in Distanz von der Matrixoberfläche halten soll. Zur Anknüpfung an Agarose, die mit Cyansäurebromid aktiviert wurde, trägt die Alkylkette an ihrem Ende eine primäre Aminogruppe.

Reaktion dieses Derivats mit aktivierter Sepharose lieferte das Affinitätssorbens AHA-Sepharose, das aus dem Gemisch von ADA und BSA nur die ihr Substrat erkennende ADA band. Diese konnte anschließend mit 1M Kochsalzlösung abgelöst werden. Aus dem Gemisch von ADA mit der Globulinfraktion wurde zusätzlich ein Teil des Begleitproteins nach einem anderen als dem biospezifischen Mechanismus gebunden. Hierbei wurde in der anschließenden Elution mit 1M Kochsalzlösung nur ein sehr unreines Enzym abgelöst.

Spezifische Elution mit 8mM Adenosinlösung löste die ADA ebenfalls vom Sorbens. Dies war von Vorteil bei der Chromatographie des Globulingemisches mit ADA, da die spezifische Elution Fremdprotein in wesentlich geringerem Maße ablöste als 1M Kochsalzlösung. Durch Elutionsversuche mit anderen Nucleosiden konnte gezeigt werden, daß nur das Substrat Adenosin und in geringerem Maße das Produkt Inosin die Lösung der spezifischen Bindung bewirkten.

Durch Versuche an Sorbentien, bei denen der spezifische Ligand formal immer weiter abgebaut worden war (AH-Adenin-, ω-Aminohexyl-, n-Hexyl- und n-Propyl-Sepharose), wurde die außerordentlich große Bindungskapazität des spacers durch Ausbildung hydrophober Bindungen mit Proteinen aufgezeigt. Je schwerer löslich ein Protein in Wasser ist, je mehr hydrophobe Gruppen es also an seiner Oberfläche trägt, desto stärker wird es von dem spacer gebunden.

Die durch die Synthese des AHA notwendigerweise eingebrachte Doppelbindung in der Seitenkette ermöglichte es, durch ihre Überführung in ein Glykol den spacer hydrophil zu machen. Reaktion dieses Derivats mit aktivierter Sepharose lieferte das Affinitätssorbens DHAHA-Sepharose.

Dieses Sorbens band die ADA nicht mehr so fest, so daß bei der Chromatographie des Gemisches von ADA und BSA mit Puffer der gleichen Ionenstärke wie bei AHA-Sepharose das Enzym nicht mehr gebunden wurde. Erst als die Ionenstärke um mehr als die Hälfte verringert wurde, konnte eine ähnliche Auftrennung wie an AHA-Sepharose erzielt werden. Die Chromatographie des Globulingemisches mit ADA unter diesen Bedingungen führte zu ähnlichen Ergebnissen wie an AHA-Sepharose.

Einmalige Chromatographie eines Kälberdarmschleimhautextraktes an AHA-Sepharose reicherte die ADA 55-fach an, jedoch konnte kein reines Enzym isoliert werden. Die gleiche Chromatographie an DHAHA-Sepharose lieferte ein unreineres Enzym. In beiden Fällen konnte aber eine vollständige Trennung von der in der Mucosa zusammen mit der ADA als aktivstes Enzym vorhandenen alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1) erreicht werden.

Aus dem in den Sättigungsgrenzen 50-70% mit Ammoniumsulfat ausfallenden Proteingemisch aus Rattenleberhomogenat, das nur sehr wenig ADA enthält, konnte ebenfalls durch einmalige Chromatographie eine hohe Anreicherung erzielt, aber keine reine ADA isoliert werden. Das bessere Ergebnis lieferte wiederum AHA-Sepharose.

Die Diskussion schätzt die verschiedenen Bindungsmechanismen der dargestellten Affinitätssorbentien ab und setzt sie in Beziehung zueinander. Die Festigkeit der spezifischen Bindung wird allein von der Dissoziationskonstanten K_i des Komplexes von Enzym und gebundenem Effektor bestimmt. Da sie experimentell nicht zugänglich ist, wird als Maßzahl der K_s-Wert, d.i. die entsprechende Maßzahl des gelösten Effektors, verwendet. Die stärksten Nebenwirkungen sind die von der Alkylkette des spacers ausgehenden hydrophoben Bindungen. Hat der immobilisierte Ligand einen kleinen K_s-Wert ($\leq 10^{-5}$ [Mol·l^{-1}]), kann man die Parameter des umgebenden Mediums weitgehend variieren, ohne eine Enzymablösung befürchten zu müssen, wodurch die nicht spezifische Bindung von Fremdprotein weitgehend eingeschränkt werden kann. Bei großen K_s-Werten der immobilisierten Effektoren kann man zusätzlich zur biospezifischen Bindung einen Teil der Bindungskapazität des hydrophoben spacers zur Bindung des Enzyms ausnutzen ("compound affinity" nach Barry und O'Carra (1973)). Dieser Fall ist bei der Chromatographie an AHA-Sepharose verwirklicht. Das Fremdprotein wird hierbei allerdings ebenfalls fester gebunden. Nur die spezifische Elution gewährleistet dann die Isolierung eines einigermaßen reinen Enzyms und beweist gleichzeitig die noch bestehende Dominanz des biospezifischen Erkennungsmechanismus. Wird der spacer hydrophil gemacht wie im Falle der DHAHA-Sepharose, überwiegt Affinitätschromatographie so weit, daß sich die Festigkeit der Bindung praktisch nur nach dem K_s-Wert richtet. Dieser ist aber beim DHAHA bereits so groß, daß es die ADA nur sehr schwach bindet und daher keine großen Enzymanreicherungen bewirkt.

5. Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät der Firma Electrothermal, das mit einem korrigiert messenden Thermometer ausgestattet ist, gemessen.

Die UV-Spektren wurden mit dem registrierenden Spektralphotometer SP 800 A der Firma Unicam gemessen.

Die IR-Spektren wurden mit dem Infrarot-Gitterspektrometer Modell 457 der Firma Perkin-Elmer aufgenommen. Flüssige Substanzen (fl.) wurden in einer NaCl-Küvette (d = 0,05 cm), feste Substanzen als KBr-Preßling gemessen. Die Absorptionsmaxima werden ausschließlich durch Angabe der Wellenzahl $[cm^{-1}]$ bezeichnet.

Die Elementaranalysen führte das Mikroanalytische Labor Ilse Beetz in Kronach/Oberfranken aus.

Alle Versuche, bei denen ein bestimmter pH-Wert aufrecht erhalten werden mußte, wurden mit Hilfe des Autotitrators TTT 11 mit automatischer Bürette ABU 12, pH-Meter 26 und Titrigraph SBR 2 C der Firma Radiometer durchgeführt.

Die Lichtabsorptionsmessungen wurden im Spektralphotometer PMQ II der Firma Zeiss oder im Filterphotometer Eppendorf durchgeführt.

Zentrifugationen erfolgten in der Ultrazentrifuge Spinco L 2-65 B der Firma Beckmann mit den Rotoren 30 bzw. 42 Ti.

Die Gefriertrocknungen wurden mit dem Gerät GT 2 der Firma Leybol-Heraeus durchgeführt.

Der Brechungsindex wurde mit dem Abbé-Refraktometer der Firma Kikuchi gemessen.

Dünnschichtchromatographie

Es wurden zwei Systeme verwendet:

System A: Polyäthylenimin-imprägnierte Cellulose-Fertigplatten PEI-Cellulose-F der Firma Merck. Die Entwicklung erfolgte mit 1M LiCl-Lösung. Die Substanzflecken konnten an der Fluoreszenzlöschung des Indikators im kurzwelligen UV erkannt werden.

System B: Kieselgel-Fertigplatten Typ SiF der Firma Riedel-de Haën. Die Entwicklung erfolgte mit Dioxan, Substanzflecken wurden durch Fluoreszenzlöschung des Indikators im kurzwelligen UV erkannt. Zusätzlich konnten Substanzen mit einer primären aliphatischen Aminogruppe durch Sprühen mit einer 0,1-proz. Lösung von Ninhydrin und anschließendes 15-min. Erwärmen der Platte auf 80 °C an der violetten Färbung erkannt werden.

Tab. 4 faßt die R_f-Werte und die Reaktion mit Ninhydrin der in dieser Arbeit behandelten Purinderivate zusammen.

Tab. 4: Dünnschichtchromatographie von Purinderivaten.

	A	6-MP	6-MMP	AH-adenin	CPA	AHA	DHCPA	DHAHA
System A	0,46	0,25	0,37	0,53	0,75	0,72	0,76	0,83
System B	0,09	0,11	0,37	0,00	0,60	0,00	0,26	0,00
Ninhydrin	-	-	-	+	-	+	-	+

Säulenchromatographie

Bei der präparativen Säulenchromatographie der Adenosinderivate wurde die Absorption des Eluats bei 254 nm kontinuierlich mittels eines Durchflußphotometers Uvicord II der Firma LKB und die Leitfähigkeit mit Hilfe eines Konduktoskops E 365 B der Firma Metrohm gemessen

und beide Größen von einem Sechskanal-Fallbügelschreiber 6520-C der Firma LKB registriert. Die Aufteilung in Fraktionen erfolgte mit einem Fraktionssammler Ultrorac 7000 der Firma LKB. Wenn die UV-Absorption des Eluats außerhalb des Meßbereichs des Durchflußphotometers lag, wurden den Fraktionen in Abständen Aliquots entnommen, 1:100 verdünnt und die Extinktion bei 260 nm im Spektralphotometer PMQ II gemessen.

Bei der Chromatographie an Agarose-Derivaten wurde die Absorption des Eluats bei 280 nm kontinuierlich mit einem Spektralphotometer 101-6 der Firma Hitachi und Durchflußküvette 178-QS der Firma Hellma gemessen und von einem Schreiber Typ Servogor 541 der Firma Metrawatt registriert. Das Aufteilen in Fraktionen erfolgte mittels eines Fraktionssammlers Ultrorac 7000 der Firma LKB.

Reagentien

Sephadex G-15 und Sepharose 4B waren Produkte der Firma Pharmacia. Trypsin, Cyansäurebromid, Ninhydrin-Sprühreagens, 6-Mercaptopurin, Kieselgel 60 und Osmium(VIII)-oxid waren Produkte der Firma Merck-Schuchardt. Boehringer lieferte Adenosin, Adenosin-aminohydrolase und die Testkombination "Alkalische Phosphatase". Butadien-1,3 wurde von den Firmen Wacker* bzw. Baker bezogen. Rinderserumalbumin und Kieselgur des Typs Hyflo-Super-Cel waren Produkte der Firma Serva. Alle anderen Chemikalien sind Handelsware.

Bromacetamid

300 g (1,80 Mol) Bromessigsäureäthylester wurden auf -18 °C abgekühlt, portionsweise mit 400 ml eiskalter 20-proz. Ammoniaklösung versetzt und 15 min. lang kräf-

*) Ich danke der Firma Wacker GmbH für das im Rahmen der Hochschullieferungen kostenlos überlassene Butadien-1,3.

tig durchgeschüttelt, wobei die Temperatur in der Reaktionsmischung ständig unter -15 °C gehalten wurde. Das sich in farblosen Flocken abscheidende Produkt wurde auf einer Nutsche abgesaugt und das Filtrat abermals 15 Min. lang bei -18 °C geschüttelt. Nach Absaugen des hierbei noch entstandenen Produkts wurde das Filtrat mit 100 ml eiskalter 25-proz. Ammoniaklösung versetzt und ein drittes Mal 15 Min. lang bei -18 °C geschüttelt. Die vereinigten Mengen Produkt wurden mit 60 ml Äthanol von -20 °C gewaschen und über Nacht im evakuierten Exsikkator über P_2O_5 getrocknet.
Ausbeute: 216 g (87%).
Schmp.: 86-88 °C.
(Papendieck (1892): Schmp.: 91 °C).

Bromacetonitril

Die Mischung von 216 g (1,56 Mol) Bromacetamid und 216 g P_2O_5 wurde eine Stunde lang bei 140 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde der Ansatz im Ölpumpenvakuum destilliert, wobei die Hauptmenge an Produkt bei 36 °C überging.
Ausbeute: 135 g (72%).
$Sdp._{760}$: 147 °C.
IR (fl.): 2258 (-C≡N).
(Steinkopf (1905): $Sdp._{24}$: 60-62 °C).

1-Brom-5-cyano-2-penten

In einer Kühlfalle (-78 °C) wurden 45 ml (0,5 Mol) Butadien-1,3 kondensiert und zu der auf -20°C abgekühlten Lösung von 58 g (0,48 Mol) Bromacetonitril in 75 ml wasserfreiem CH_3CN gegeben. Der Ansatz wurde in ein innen vollständig mit Teflon ausgekleidetes Stahldruckgefäß (V = 650 ml) eingefüllt und mit 5 g durch dreistündiges Erhitzen auf 200 °C im Vakuum aus $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ dargestelltem wasserfreiem $FeCl_2$ versetzt. Die Reaktionsmischung wurde unter Rühren 3 Stdn. lang bei 120 °C

erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft und die zurückbleibende ölige braune Flüssigkeit über eine Kieselgelsäule (7 x 35 cm) mit $CHCl_3$ als Elutionsmittel filtriert, das $CHCl_3$ verdampft und die zurückbleibende gelbe Flüssigkeit im Ölpumpenvakuum über eine Einstichkolonne fraktioniert. Die Hauptmenge ging bei 110 °C über. Ein mit dem Produkt benetzter Kupferdraht färbte die entleuchtete Bunsenflamme intensiv grün.

Ausbeute: 31,2 g (37%).

$Sdp._{760}$: 186 °C (Zers.).

n_D^{20}: 1,5027.

IR (fl.): 3040 (=C-H); 3000 (Br-C-H); 2930, 2856 ($-CH_2-$); 2250 (-C≡N); 1664 (-C=C-, trans); 1436, 1425 (-C-C-); 966 (zweifach substituierte trans-Doppelbindung); 602 (-C-Br).

C_6H_8BrN (174,0): Ber. Br 45,91
Gef. 46,22

N^6-(5-Cyano-2-pentenyl)-adenosin

10 g (37,5 mMol) Adenosin wurden unter Erwärmen in 300 ml wasserfreiem N,N-Dimethylformamid gelöst und diese Lösung mit 9,44 g (54,3 mMol) 1-Brom-5-cyano-2-penten versetzt. Nach 72-stündigem Stehen bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft und der Rückstand zweimal mit je 100 ml Aceton verrührt, das jedesmal dekantiert wurde. Der Rückstand wurde mit 60 ml H_2O aufgenommen, die Lösung auf 95 °C erhitzt, der pH-Wert mit 6N NaOH auf 7,5 eingestellt und bei dieser Temperatur solange konstant gehalten, bis keine Laugenaufnahme mehr erfolgte. Dem Ansatz wurde das Produkt mit Essigsäureäthylester durch zweistündige kontinuierliche Extraktion entzogen. Es kristallisierte in einer Woche vollständig aus der Extraktionsflüssigkeit, verunreinigt mit einer Spur Adenosin.

Ausbeute: 5,32 g (39%).

Zur Abtrennung der Ausgangssubstanz wurden 500 mg (1,87 mMol) Rohprodukt in 10 ml 0,05M Ammoniumcarbonatpuffer (pH = 7,5) gelöst und mit diesem Puffer an Sephadex G-15 chromatographiert. Die Gipfelfraktionen wurden gesammelt und zweimal lyophilisiert. Schließlich kristallisierten aus 50 ml Essigsäureäthylester 252 mg (51%) analysenreines Produkt.

Schmp.: 140 °C.

UV: λ_{max} (pH = 1) = 264 nm; $\varepsilon_{max} = 18{,}1 \cdot 10^3$ $[l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$
λ_{max} (pH = 7) = 267 nm; $\varepsilon_{max} = 17{,}3 \cdot 10^3$ $[l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$.

IR (KBr): 3455 (-OH); 3322, 3143 (-NH); 2922, 2853 ($-CH_2-$); 2259 ($-C\equiv N$); 1619 (-C=N).

$C_{16}H_{20}N_6O_4$ (360,4): Ber. C 53,33 H 5,59 N 23,32
Gef. 53,06 5,47 22,91

N^6-(6-Amino-2-hexenyl)-adenosin

409 mg (1,14 mMol) N^6-(5-Cyano-2-pentenyl)-adenosin und 550 mg (2,30 mMol) $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ wurden in 20 ml CH_3OH gelöst und unter Rühren bei Eisbadtemperatur portionsweise mit 430 mg (11,6 mMol) $NaBH_4$ versetzt. Der Ansatz färbte sich tiefschwarz. Nach 16-stündiger Reaktion bei Raumtemperatur wurde vorsichtig soviel 2N HCl zugegeben, bis alles gelöst und die Lösung hellrosa gefärbt war. Das CH_3OH wurde im Vakuum verdampft, die zurückbleibende Lösung mit 10 ml 0,05M Ammoniumcarbonatpuffer (pH = 7,5) versetzt und mit diesem Puffer an Sephadex G-15 chromatographiert. Die Gipfelfraktionen wurden zweimal lyophilisiert. Nach Tüpfeln einer 0,1-proz. wäßrigen Lösung der Substanz auf Kieselgel und Besprühen des Flecks mit einer 0,1-proz. Lösung von Ninhydrin zeigte der nach 15-min. Trocknen bei 80 °C entstandene violette Fleck die ω-Aminogruppe der Seitenkette an, da weder Adenosin noch das Ausgangsmaterial mit Ninhydrin reagieren.

Ausbeute: 337 mg (84%).

Schmp.: 161 °C.

UV: λ_{max} (pH = 1) = 263 nm; $\varepsilon_{max} = 17{,}1 \cdot 10^3$ $[l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$
λ_{max} (pH = 7) = 266 nm; $\varepsilon_{max} = 14{,}1 \cdot 10^3$ $[l\ Mol^{-1}\ cm^{-1}]$.

IR (KBr): 3600-3100 (-OH und -NH); 2930, 2858 ($-CH_2-$); 1620 (-C=N).

$C_{16}H_{24}N_6O_4$ (364,4): Ber. C 52,74 H 6,64
Gef. 51,84 7,18

(Die Substanz ließ sich nur unter sehr großen Verlusten umkristallisieren; daher wurde die Elementaranalyse vom Lyophilisat durchgeführt.)

N^6-(2,3-Dihydroxy-5-cyanopentyl)-adenosin

1290 mg (3,58 mMol) N^6-(5-Cyano-2-pentenyl)-adenosin wurden in 100 ml Dioxan gelöst und mit 1000 mg (3,94 mMol) OsO_4 versetzt. Der nach 48-stündigem Rühren bei Raumtemperatur entstandene Osmiumsäureester wurde abfiltriert, in der Mischung von 40 ml H_2O und 70 ml Pyridin gelöst und mit der Lösung von 3,6 g Natriumdisulfit in 30 ml H_2O versetzt. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die braune Lösung zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 50 ml H_2O aufgenommen und die Lösung noch einmal eingedampft. Nach Aufnehmen des Rückstandes in 20 ml 0,05M Ammoniumcarbonatpuffer (pH = 7,5) wurde er mit diesem Puffer an Sephadex G-15 chromatographiert, die Gipfelfraktionen gesammelt, lyophilisiert und das Lyophilisat nach Aufnehmen in 10 ml H_2O abermals an Sephadex G-15 chromatographiert. Die Gipfelfraktionen wurden gesammelt und zweimal lyophilisiert.
Ausbeute: 936 mg (67%).
Schmp.: 109-112 °C.
UV: λ_{max} (pH = 1) = 264 nm; $\varepsilon_{max} = 17{,}4 \cdot 10^3$ $[l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$
λ_{max} (pH = 7) = 267 nm; $\varepsilon_{max} = 18{,}9 \cdot 10^3$ $[l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$.
IR (KBr): 3600-3100 (-OH und -NH); 2930, 2860 (s) ($-CH_2-$); 2252 (-C≡N); 1625 (-C=N).

Zur Analyse wurde eine Probe aus sehr wenig Wasser unter großen Verlusten umkristallisiert.

$C_{16}H_{22}N_6O_6$ (394,4): Ber. C 48,73 H 5,62
Gef. 48,45 5,91

N^6-(2,3-Dihydroxy-6-aminohexyl)-adenosin

492 mg (1,25 mMol) N^6-(2,3-Dihydroxy-5-cyanopentyl)-adenosin und 605 mg (2,54 mMol) $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ wurden in 40 ml CH_3OH gelöst und portionsweise unter Rühren bei Eisbadtemperatur mit 594 mg (15,6 mMol) $NaBH_4$ versetzt. Nach 16 Stdn. wurde vorsichtig soviel 2N HCl zugegeben, bis sich der Niederschlag aufgelöst und die Lösung eine hellrosa Farbe angenommen hatte. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum verdampft, der Rückstand mit 10 ml 0,05M Ammoniumcarbonatpuffer (pH = 7,5) aufgenommen und mit diesem Puffer an Sephadex G-15 chromatographiert. Die Gipfelfraktionen wurden zweimal lyophilisiert. Die Tüpfelprobe zeigte die Aminogruppe der Seitenkette an.
Ausbeute: 194 mg (39%).
Schmp.: 156-162 °C (Zers.).
UV: λ_{max}(pH = 1) = 265 nm; $\varepsilon_{max} = 18{,}8 \cdot 10^3$ $[l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$
λ_{max}(pH = 7) = 268 nm; $\varepsilon_{max} = 17{,}2 \cdot 10^3$ $[l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$.
IR (KBr): 3650-3100 (-OH und -NH); 2930, 2860 (s) ($-CH_2-$); 1621 (-C=N).

$C_{16}H_{26}N_6O_6$ (398,4):	Ber.	C 48,23	H 6,58
	Gef.	48,91	6,70

(Die Substanz ließ sich nicht umkristallisieren; daher wurde die Elementaranalyse vom Lyophilisat durchgeführt.)

6-Methylmercapto-purin

1155 mg (7,10 mMol) 6-Mercaptopurin wurden in der Mischung von 7,5 ml H_2O und 15 ml 2N NaOH gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise mit 1100 mg (7,75 mMol) Methyljodid versetzt. Nach 2 Stdn. wurde der Ansatz im Eisbad gekühlt und der pH-Wert mit konz. Essigsäure auf 5 gestellt, wobei das Produkt als farbloser Niederschlag ausfiel. Es wurde abfiltriert und aus 100 ml H_2O umkristallisiert.
Ausbeute: 1180 mg (71%; es entsteht das Trihydrat).
Schmp.: 211-215 °C.

UV: λ_{max} (pH = 1) = 295 nm.
(Elion e.a. (1952): Schmp.: 218-220 °C (Zers.); λ_{max} (pH = 1) = 295 nm.

N^6-(6-Aminohexyl)-adenin

1 g (6,04 mMol) 6-Methylmercapto-purin wurden mit 10 g (86,4 mMol) 1,6-Diaminohexan vermengt und im abgeschmolzenen Glasrohr 16 Stdn. lang bei 140 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz mit 100 ml Benzol verrührt und 16 Stdn. lang bei 4 °C stehengelassen. Der zurückbleibende Niederschlag wurde abfiltriert und aus 100 ml des Gemisches von Essigsäureäthylester und CH_3CN (50/50; v/v) umkristallisiert.
Ausbeute: 1091 mg (77%).
Schmp.: 151-152 °C.
UV: λ_{max} (pH = 1) = 271 nm; $\varepsilon_{max} = 19{,}1 \cdot 10^3 \left[l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}\right]$
λ_{max} (pH = 7) = 267 nm; $\varepsilon_{max} = 16{,}6 \cdot 10^3 \left[l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}\right]$.
IR (KBr): 3362, 3265 (-NH); 2928, 2852 ($-CH_2-$); 1620 (-C=N).

$C_{11}H_{18}N_6$ (234,3):		C	H	N
	Ber.	56,39	7,74	35,87
	Gef.	56,76	7,70	35,70

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach der von Lowry e.a. (1951) angegebenen Methode gemessen. Der zu testenden Proteinlösung wurden Aliquots bis zu 1 ml Größe entnommen, deren Proteingehalt jedoch nicht größer als 0,1 mg sein durfte und mit 0,1N NaOH zu 2 ml aufgefüllt. Nach 10 min. wurden 2 ml 0,8mM $CuSO_4$-Lösung in 0,2N NaOH, die 0,38M an Na_2CO_3 und 1,9mM an Seignettesalz war, zugegeben, nach weiteren 10 Min. 1 ml 0,12M Phosphomolybdatlösung und die Extinktion bei 578 nm anschließend nach 30 Min. gegen einen Reagentienleerwert gemessen. Die jeweilige Proteinkonzentration ergab sich aus einer Eichkurve, die zuvor mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration aufgestellt worden war.

Aktivitätstest der ADA

Die ADA-Aktivität wurde nach der von Bergmeyer e.a. (1970) angegebenen Methode bestimmt. Aliquots der zu testenden Lösungen wurden in eine $4{,}5 \cdot 10^{-5}$M Lösung von Adenosin in 0,02M Natriumphosphatpuffer (pH = 7) pipettiert, die Abnahme der Extinktion bei 265 nm im Spektralphotometer PMQ II verfolgt und von einem Schreiber Servogor RE 543 der Firma Metrawatt registriert. Die Aliquots durften nicht mehr als 0,035 U ADA enthalten, damit die Extinktionsabnahme noch linear verlief. Beim Übergang einer 1M Lösung Adenosin in Inosin nimmt die Extinktion bei 265 nm um $8{,}1 \cdot 10^{3}$ ab.

Aktivitätstest der AP

Die Aktivitätsbestimmung der AP erfolgte nach der von Bessey e.a. (1946) angegebenen Methode. Hierzu wurden Aliquots der zu bestimmenden Lösung zu einer 5,5mM Lösung von Natrium-p-Nitrophenylphosphat in 0,05M Glycinpuffer (pH = 10,5), der 0,05mM an $MgCl_2$ war, pipettiert und die Extinktionszunahme bei 405 nm im Photometer Eppendorf verfolgt und vom Eppendorfschreiber registriert. Beim Übergang einer 1M Lösung Natrium-p-Nitrophenylphosphat in Natrium-p-Nitrophenolat ergibt sich eine Extinktionszunahme bei 405 nm von $18{,}5 \cdot 10^{3}$.

Kinetische Konstanten von AHA und DHAHA

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurden Aktivitätstests der ADA durchgeführt, bei denen die Enzymkonzentration konstant gehalten wurde ($4{,}44\ [U \cdot l^{-1}]$; $0{,}022\ [g \cdot l^{-1}]$) und die Substratkonzentration von $9{,}0 \cdot 10^{-5}$ bis $0{,}45 \cdot 10^{-5}\ [Mol \cdot l^{-1}]$ variiert wurde. Bei den Hemmversuchen wurden Versuchsreihen unter denselben Bedingungen durchgeführt, nur daß bei den einzelnen Ansätzen die beiden Hemmstoffe AHA und DHAHA in konstanter Konzentration ($[AHA] = 4{,}80 \cdot 10^{-5}$ und $[DHAHA] = 8{,}93 \cdot 10^{-5}\ [Mol \cdot l^{-1}]$)

zugegen waren. Die in den einzelnen Tests ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten v bzw. deren Kehrwerte bei den jeweiligen Substratkonzentrationen $\left[S_o\right]$ bzw. deren Kehrwerte sind in Tab. 5 angegeben.

Aus den in der Tab. 5 angegebenen Ordinatenwerten $\frac{1}{v}$ und Abzissenwerten $\frac{1}{\left[S_o\right]}$ wurde mit einem Rechner PC-1002 der Firma Sharp die Regressionsgrade

$$y = mx + b$$

errechnet. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Abzisse (y = 0) liefert den Wert $-\frac{1}{K_M}$. Somit ergibt sich:

$$-\frac{1}{K_M} = -\frac{b}{m}$$

$$K_M = \frac{m}{b}$$

Die Inhibitorkonstante K_s errechnet sich zu:

$$K_s = \frac{\left[I\right]}{\frac{K_M'}{K_M} - 1}$$

Sepharose-Derivate

a) Aktivierung

25 ml abgesetzte Sepharose wurden durch Waschen mit 1 l H_2O vom Konservierungsmittel befreit und in die frisch bereitete Lösung von 3,75 g (35,4 mMol) Cyansäurebromid in 50 ml H_2O eingerührt. Die Reaktion fand in einem bei 25 °C thermostatisierten Gefäß statt. Der pH-Wert wurde mit 6N NaOH auf 11 eingestellt und solange konstant gehalten, bis keine Laugenaufnahme mehr stattfand (ca. 10 Min.; Laugenverbrauch: 10 ml = 60 mVal). Dieses aktivierte Gel wurde sofort filtriert und schnell mit 500 ml eiskalter 0,1M Natriumhydrogencarbonatlösung (pH = 9,1) gewaschen.

Tab. 5: Kinetische Konstanten von A, AHA und DHAHA.

	Adenosin				AHA			DHAHA			
	$[S_o]\cdot 10^5$ Mol/l	$\left[\frac{1}{S_o}\right]\cdot 10^{-4}$ 1/Mol	$v\cdot 10^6$ Mol/l·min	$\frac{1}{v}\cdot 10^{-5}$ l·min/Mol	$v\cdot 10^6$ Mol/l·min	$\frac{1}{v}\cdot 10^{-5}$ l·min/Mol	$[S_o]\cdot 10^5$ Mol/l	$\left[\frac{1}{S_o}\right]\cdot 10^{-4}$ 1/Mol	$v\cdot 10^6$ Mol/l·min	$\frac{1}{v}\cdot 10^{-5}$ l·min/Mol
1	9,31	1,07	5,52	1,81	5,41	1,85	8,67	1,15	5,93	1,69
2	4,66	2,15	4,27	2,34			4,40	2,27	4,49	2,23
3							4,21	2,37	3,90	2,56
4	3,73	2,69	3,79	2,64	3,48	2,87	3,53	2,84	4,40	2,27
5	3,26	3,07	3,40	2,94			3,49	2,86	4,17	2,40
6	2,79	3,58	3,34	2,99	3,03	3,30	2,63	3,80	3,61	2,77
7	2,33	4,30	2,89	3,46			2,62	3,82	3,44	2,91
8	1,86	5,37	2,67	3,75	2,30	4,34	1,78	5,62	2,69	3,72
9	1,40	7,16	2,16	4,63	1,95	5,13	1,32	7,60	1,82	5,49
10							1,30	7,68	1,87	5,34
11							0,88	11,41	1,44	6,97
12							0,88	11,32	1,45	6,89
13							0,44	22,81	0,79	12,71
14							0,45	22,46	0,86	11,57
r			0,9954		0,9980				0,9956	
m			4,538		5,393				4,903	
b			$1,403\cdot 10^5$		$1,355\cdot 10^5$				$1,183\cdot 10^5$	
K_M			$3,23\cdot 10^{-5}$		—				—	
K_M'			—		$3,98\cdot 10^{-5}$				$4,14\cdot 10^{-5}$	
K_s			—		$2,07\cdot 10^{-4}$				$3,15\cdot 10^{-4}$	

b) Umsetzung mit Aminen

Die betreffenden Amine wurden mit einer Ausnahme in 0,1M Natriumhydrogencarbonatlösung (pH = 9,1) gelöst, die aktivierte Sepharose in 25 - 50 ml dieser Lösung eingerührt und der Ansatz langsam 16 Stdn. bei 4 °C gerührt. Das Gel wurde auf einer Nutsche abgesaugt und mit je 500 ml 1M NaCl-Lösung und H_2O gewaschen. In den mit dem Filtrat vereinigten Waschflüssigkeiten wurde die UV-Extinktion gemessen, sofern absorbierende Amine zur Ankopplung eingesetzt worden waren und durch Differenzbildung mit der Einwaage der gebundene Anteil ermittelt. Bei den Gelen b), c) und g) (s. folgende Aufstellung) wurden wegen der schwierigen Darstellung der betreffenden Amine nur geringe Überschüsse eingesetzt, so daß vielleicht nach der Kopplung noch Imidocarbonatgruppen im Gel verblieben sein konnten. Diese Gele rührten anschließend 2 Stdn. bei Raumtemperatur in einer 1M Lösung von 2-Aminoäthanol (pH = 8). Nach Abfiltrieren des Gels wurde es je dreimal mit 1M NaCl-Lösung abwechselnd bei pH = 4 und pH = 8 gewaschen, anschließend mit H_2O, im zum Säulenlauf vorgesehenen Puffer aufgenommen und zur Säule gegossen. Die für die analytischen Läufe benutzten Säulen hatten einen inneren Durchmesser von 10 mm, waren 27 cm lang, das Volumen betrug also 21 ml.

Durch Einrühren von aktivierter Sepharose in folgende Aminlösungen wurden diese Sepharose-Gele dargestellt:

a) ω-Hydroxyäthyl-Sepharose

1M 2-Aminoäthanollösung in 0,1M $NaHCO_3$-Lösung.

b) AHA-Sepharose

50 mg (137 µMol) AHA wurden in 25 ml 0,1M $NaHCO_3$-Lösung gelöst, die Lösung war also 5,5mM an AHA. 25 µl dieser Lösung wurden mit 3 ml H_2O vermischt und

die Extinktion dieser Lösung bei 267 nm ($\hat{=} \lambda_{max}$ von AHA bei pH = 7) gegen H_2O gemessen. $E_{267} = 0{,}755$; hieraus folgt: $\varepsilon_{max} = 16{,}6 \cdot 10^3$ $[l \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$. Die vereinigten Filtrate und Waschflüssigkeiten nach der Umsetzung hatten ein Volumen von 1116 ml, die Extinktion dieser Lösung bei 267 nm war $E_{267} = 0{,}23$; hieraus folgt: 5,62 mg AHA sind in der Waschflüssigkeit und somit 44,4 mg an das Gel gebunden. Das ergibt eine Beladung von 4,88 µMol/ml Gel.

c) AH-Adenin-Sepharose

45,9 mg (196 µMol) AH-Adenin wurden in 40 ml 0,1M $NaHCO_3$-Lösung gelöst und der Extinktionskoeffizient wie unter b) beschrieben bestimmt. In dieser Lösung rührten 16 Stdn. lang 20 ml aktivierte Sepharose. Nach dem Filtrieren und Waschen ergab sich durch Messung der Extinktion der Waschflüssigkeit der gebundene Anteil zu 25,6 mg, was einer Beladung von 5,47 µMol/ml Gel entspricht.

d) ω-Aminohexyl-Sepharose

50 ml 1M Lösung von 1,6-Diaminohexan in 0,1M $NaHCO_3$-Lösung.

e) n-Hexyl-Sepharose

50 ml 1M Lösung von n-Hexylamin in dem Gemisch von 0,1M $NaHCO_3$-Lösung und DMF (4:1; v/v).

f) n-Propyl-Sepharose

50 ml 1M Lösung von n-Propylamin in 0,1M $NaHCO_3$-Lösung.

g) DHAHA-Sepharose

51 mg DHAHA (128 µMol) wurden in 25 ml 0,1M $NaHCO_3$-Lösung gelöst, die Lösung war also 5,18 mM an DHAHA. Mit dem wie bei b) bestimmten Extinktionskoeffizienten ergab sich durch Messung der Extinktion der Waschflüssigkeit eine Menge von 11,2 mg im Waschwasser und somit ein gebundener Anteil von 39,8 mg, was einer Beladung von 4,0 µMol/ml Gel entspricht.

Rattenleberhomogenat

Die Lebern von 10 durch Dekapitation getöteten Ratten (66,5 g) wurden mit 330 ml 0,01M Natriumphosphatpuffer (pH = 7,4), der $0{,}25 \cdot 10^{-3}$M an Dithioerythrit war, im Homogenisator nach Potter/Elvehejm homogenisiert und das Homogenat 1 Stde. bei 11700xg zentrifugiert. Der Überstand (250 ml) wurde langsam mit 60,85 g $(NH_4)_2SO_4$ versetzt ($\hat{=}$ 40% Sättigung) und 30 Min. lang bei 11700xg zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand (270 ml) langsam mit 17,01 g $(NH_4)_2SO_4$ ($\hat{=}$ 50% Sättigung) versetzt und 30 Min. lang bei 11700xg zentrifugiert. Das Sediment wurde in 60 ml 0,02M Natriumphosphatpuffer (pH = 7) aufgenommen und zweimal gegen diesen Puffer dialysiert (Fraktion I; 40-50% Sättigung). Der Überstand (270 ml) wurde mit 17,4 g $(NH_4)_2SO_4$ ($\hat{=}$ 60% Sättigung) versetzt und 30 Min. lang bei 11700xg zentrifugiert. Das Sediment wurde in 30 ml 0,02M Natriumphosphatpuffer (pH = 7) aufgenommen und zweimal gegen diesen Puffer dialysiert (Fraktion II; 50-60% Sättigung). Der Überstand (250 ml) wurde mit 17,25 g $(NH_4)_2SO_4$ ($\hat{=}$ 70% Sättigung) versetzt und 30 Min. lang bei 11700xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 10 ml 0,02M Natriumphosphatpuffer (pH = 7) aufgenommen und zweimal gegen diesen Puffer dialysiert. (Fraktion III; 60-70% Sättigung). In den Dialysaten wurden die Proteinkonzentrationen und die ADA-Aktivitäten gemessen, Tab. 6 faßt die Meßdaten zusammen.

Tab. 6: Fraktionierung von Rattenleberhonogenat

	Sätt. %	V ml	Protein mg/ml	Aktivität ges.mU/ml		spez.Akt. ges.	mU/mg
Fraktion I	40-50	55,6	18,95	1054	0,10	5,61	5,33
Fraktion II	50-60	31,6	29,36	928	0,44	13,9	15,0
Fraktion III	60-70	13,2	22,55	298	0,66	8,71	29,3

Fraktion III wies die größte spez.Akt. auf, jedoch war die Hauptmenge ADA schon in Fraktion II ausgefallen. In folgenden Präparationen wurde daher das in den Grenzen 50-70% Sättigung mit $(NH_4)_2SO_4$ ausfallende Protein als Ausgangsmaterial für die Präparation von ADA aus Rattenleberhomogenat verwendet.

Globuline aus Rattenserum

Die Globulinfraktion wurde aus dem bei der Tötung der Ratten zur Präparation des Rattenleberhomogenats (s.o.) anfallenden Blut gewonnen. Es wurde zunächst zur Gerinnung 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend das überstehende Serum vorsichtig dekantiert. Durch Fällung mit $(NH_2)_2SO_4$ und Zentrifugation wie oben beschrieben wurde das in den Sättigungsgrenzen 10-50% ausfallende Globulingemisch isoliert und zweimal gegen 0,02M Natriumphosphatpuffer (pH = 7) dialysiert. Das Dialysat enthielt 35,0 mg Protein im ml.

ADA aus Kälberdarmschleimhaut

Die ersten 2 m von 10 Dünndärmen frisch geschlachteter Kälber wurden sorgfältig mit H_2O gespült, der Länge nach aufgeschnitten und die Schleimhaut mit Holzspateln abgeschabt. Die sich so ergebenden 900 ml Schleim wurden mit 2 l H_2O verrührt und der pH-Wert dieser Suspension

mit 2N NaOH auf 9 gestellt. Unter heftigem Rühren wurde die Suspension mit 250 ml Toluol emulgiert, die Lösung von 5 g Trypsin in 250 ml H_2O eingerührt und dieser Ansatz 36 Stdn. lang bei 37 °C inkubiert. Eine Nutsche (Ø = 30 cm) wurde mit einem Filterpapier bedeckt und hierauf 200 g Kieselgur geschichtet. Filtration des Inkubats durch diese Anordnung lieferte ein klares hellbraunes Filtrat (Filtrat I). Die Kieselgurschicht wurde zweimal mit je 1 l eiskalten Wassers gewaschen, wobei eine milchige Suspension ablief (Filtrat II). Filtrat I wurde langsam mit 1925 g $(NH_4)_2SO_4$ versetzt ($\hat{=}$ 85% Sättigung). Das ausfallende Protein flotierte. Die obere Schicht wurde dekantiert und über eine dünne Schicht Kieselgur in einer Nutsche filtriert. Der zurückbleibende braune Filterkuchen ließ sich leicht abheben. Er wurde 30 Min. lang bei 11700xg zentrifugiert, wobei das Kieselgur sedimentierte und etwas Fett flotierte. Die fettige Oberschicht wurde vorsichtig abgesaugt und das Sediment verworfen. Der Überstand wurde zweimal gegen je 2 l 0,1M Ammoniumacetatpuffer (pH = 8,9) dialysiert und das Dialysat mit 350 ml 0,02M Natriumphosphatpuffer (pH = 6) verdünnt (Lösung II). Im Verlauf der Präparation wurden jeweils die Proteinkonzentrationen und die Aktivitäten der ADA und der AP gemessen, Tab. 7 faßt diese Werte zusammen.

Tab. 7: ADA-Präparation aus Kälberdarmschleimhaut.

	V	Protein		ADA			AP		
	ml	mg/ml	ges.	U/ml	ges.	U/mg	U/ml	ges.	U/mg
Filtrat I	3250	5,20	16900	0,87	2841	0,17	0,27	878	0,05
Filtrat II	2000	1,28	2560	0,14	275	0,03	0,03	65	0,03
Lösung I	156	11,84	1970	14,5	2256	1,22			
Lösung II	502	3,82	1920	3,35	1681	0,89	1,29	649	0,34

Säulenläufe

Die Testläufe wurden mit folgenden Proteinmischungen durchgeführt:

a) BSA/ADA: Ca. 5 mg BSA und ca. 20 U ADA wurden mit dem zum Lauf vorgesehenen Puffer zu 1 ml aufgefüllt und 800 µl dieser Lösung auf die Säule aufgetragen. Der verbleibende Rest wurde 1:10 verdünnt und in dieser Verdünnung die Proteinkonzentration und die ADA-Aktivität gemessen.

b) Globuline/ADA: 200 µl Globulinlösung und ca. 20 U ADA wurden mit dem zum Lauf vorgesehenen Puffer zu 1 ml aufgefüllt, 800 µl aufgetragen und im verbleibenden Rest nach Verdünnen (1:10) ADA-Aktivität und Proteinkonzentration bestimmt.

Die erste Elution erfolgte in der Regel mit Puffer allein. Es wurden Fraktionen zu 32 Tropfen ($\hat{=}$ 2 ml) bei einer Laufgeschwindigkeit von 10 sec/Tropfen gesammelt. Sämtliche Experimente erfolgten bei 4 ^{o}C. Die Absorption des Eluats bei 280 nm wurde kontinuierlich gemessen und von einem Schreiber aufgezeichnet. In jeder einzelnen Fraktion wurde die Proteinkonzentration und die ADA-Aktivität bestimmt.

In der zweiten Elution wurde in der Regel die ADA abgelöst. Hierzu wurden folgende Reagentien verwendet:

a)	0,05M NaCl in Natriumphosphatpuffer	"0,05M NaCl"
b)	0,1M NaCl - „ -	"0,1M NaCl"
c)	1M NaCl - „ -	"1M NaCl"
d)	8mM Adenosin - „ -	"8mM A"
e)	8mM Uridin - „ -	"8mM Uridin"
f)	2,6mM Guanosin - „ -	"2,6mM Guanosin"
g)	2,6mM Adenosin - „ -	"2,6mM A"
h)	8mM Inosin - „ -	"8mM Inosin"

Es wurden wiederum in jeder Fraktion Proteinkonzentration und ADA-Aktivität bestimmt. Hierbei verursachte ein NaCl-Gehalt bei keinem der beiden Tests Störungen. Auch ein Nucleosidgehalt beeinträchtigte den ADA-Test nicht, da die verwendeten Nucleoside (außer Adenosin, das bei der Elution zu Inosin hydrolysiert wird) weder Substrate noch Inhibitoren der ADA sind, lediglich also die Grundextinktion bei 265 nm anheben. Jedoch konnten aus dem letztgenannten Grunde nicht mehr so große Aliquots eingesetzt werden, so daß ein Test bei sehr geringen ADA-Aktivitäten nicht mehr möglich war. Wenn Proteintests in Fraktionen durchgeführt wurden, die Inosin enthielten, wurde im Vergleichswert eine Fraktion eingesetzt, die erfahrungsgemäß kein Protein enthielt, wohl aber Inosin in derselben Konzentration wie in der zu testenden. Hierdurch war auch ein befriedigender Proteintest möglich.

Die einzelnen Meßwerte sowohl des Protein- als auch des ADA-Tests wurden zu Elutionsdiagrammen verbunden. Die gesamte eluierte Menge beider Komponenten ergab sich aus der Summe der einzelnen Meßwerte. Wenn Proteinwerte angegeben sind, ohne daß im Diagramm eine Kurve eingezeichnet ist, handelt es sich um die gesamte im entsprechenden Dialysat enthaltene Menge.

Nach jedem Säulenlauf wurde das Gel ausgiebig mit 1M NH_3-Lösung, die 1M an NaCl war, gespült. Diese Lösung hatte sich aus vielen anderen als diejenige, die evtl. haften gebliebenes Protein im weitestgehenden ablöst, erwiesen. Nachdem die Säule wieder mit Puffer äquilibriert worden war, konnte sie erneut und auf diese Weise viele Male nacheinander ohne Einbuße der Trennleistung verwendet werden. Lediglich die hydrophoben Sorbentien (ω-Aminohexyl-, n-Hexyl- und n-Propyl-Sepharose) mußten zu jedem Lauf neu bereitet werden, da die außerordentlich starke Haftung verschiedener Proteine eine Wiederverwendung unmöglich machte.

Isolierung der ADA

Die für die Isolierung der ADA aus Kälberdarmschleimhaut- bzw. Rattenleberhomogenaten verwendeten Säulen waren größer dimensioniert (V = 50 ml). Es wurden Fraktionen zu 64 Tropfen (≙ 4 ml) gesammelt. Messung und Anzeige der UV-Absorption und Ermittlung der Proteinkonzentration bzw. der ADA-Aktivität erfolgten wie oben beschrieben. Zusätzlich wurde in jeder Fraktion die Aktivität der AP ermittelt. Da in der zweiten Elution vor allem die Proteinkonzentrationen sehr gering waren, wurden, um möglichst genaue Tests durchführen zu können, die sich als ADA-aktiv erweisenden Fraktionen vereinigt und solange gegen 0,02M Natriumphosphatpuffer dialysiert, bis das UV-Spektrum des Dialysats nur noch geringe Inosinmengen anzeigte. Anschließend wurden Aliquots des Dialysats auf Proteinkonzentration, ADA- und AP-Aktivität getestet.

6. Literaturverzeichnis

R.Axén, J.Porath und S.Ernback

Chemical Coupling of Peptides and Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides
Nature 214, 1302 (1967).

R.Axén und P.Vretblad

Binding of Proteins to Polysaccharides by Means of Cyanogen Halides. Studies on Cyanogen Bromide Treated Sephadex
Acta Chem.Scand. 25, 2711 (1971).

R.Axén und S.Ernback

Chemical Fixation of Enzymes to Cyanogen Halide Activated Polysaccharide Carriers
Eur.J.Biochem. 18, 351 (1971).

S.Barry und P.O'Carra

A Simple General Method for the Preparation of '6-Immobilized' Analogues of AMP, ATP, NAD and of Other Adenine-Containing Compounds for Affinity Chromatography
FEBS Lett. 37, 134 (1973a).

S.Barry und P.O'Carra

Affinity Chromatography of Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Linked Dehydrogenases on Immobilized Derivatives of the Dinucleotide
Biochem.J. 135, 595 (1973b).

H.U.Bergmeyer, K.Gawehn und M.Graßl

Enzyme
in Methoden der enzymatischen Analyse (H.U.Bergmeyer, Herausgeb.), Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße, Bd. I, S.388 (1970).

O.A.Bessey, O.H.Lowry und M.J.Brock

A Method for the Rapid Determination of Alkaline Phosphatase with Five Cubic Millimeters of Serum
J.Biol.Chem. 164, 321 (1946).

T.G.Brady und W.O'Connell

A Purification of Adenosine Deaminase from the Superficial Mucosa of Calf Intestine
Biochim.Biophys.Acta 62, 216 (1962).

P.O'Carra, S.Barry und T.Griffin

Spacer Arms in Affinity Chromatography: Use of Hydrophilic Arms to Control or Eliminate Non-biospecific Adsorption Effects
FEBS Lett. 43, 169 (1974a).

P.O'Carra, S.Barry und T.Griffin

Interfering and Complicating Adsorption Effects in Bioaffinity Chromatography in Methods in Enzymology (S.P.Colowick und N.O.Kaplan, Herausgeb.), Acad.Press New York, Vol. XXXIV, S.108 (1974b).

A.Coddington

Some Substrates and Inhibitors of Adenosine Deaminase
Biochim.Biophys.Acta 99, 442 (1965).

J.G.Cory und R.J.Suhadolnik

Structural Requirements of Nucleosides for Binding by Adenosine Deaminase
Biochemistry 4, 1729 (1965).

P.Cuatrecasas

Protein Purification by Affinity Chromatography
J.Biol.Chem. 245, 3059 (1970).

G.B.Elion, E.Burgi und G.H.Hitchings

Studies on Condensed Pyrimidine Systems. IX. The Synthesis of Some 6-Substituted Purines
J.Amer.Chem.Soc. 74, 411 (1952).

Z.Er-el, Y.Zaidenzaig und S.Shaltiel

Hydrocarbon-Coated Sepharoses. Use in the Purification of Glycogen Phosphorylase
Biochem.Biophys.Res.Comm. 49, 383 (1972).

D.J.Graves und Y.Wu

On Predicting the Results of Affinity Procedures in Methods in Enzymology (S.P.Colowick und N.O.Kaplan, Herausgeb.), Acad.Press New York, Vol. XXXIV, S.140 (1974).

B.H.J.Hofstee

Hydrophobic Affinity Chromatography of Proteins
Anal.Biochem. 52, 430 (1973).

H.M.Kalckar

Differential Spectrophotometry of Purine Compounds by Means of Specific Enzymes
J.Biol.Chem. 167, 461 (1947).

J.H.Lister

Fused Pyrimidines, Part II: Purines in The Chemistry of Heterocyclic Compounds (D.J.Brown,Herausgeb.), Wiley-Interscience New York, S.313 (1971).

O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr und R.J.Randall

Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent
J.Biol.Chem. 193, 265 (1951).

H.W.Moore, F.F.Rust und H.S.Klein

A Process for the Production of Halogen-Containing Nitriles
B.P. 1,024,398 (30.3.1966); ref. CA 64, 3365h (1966).

A.Papendieck

Über Bromacetamid
Ber.dtsch.chem.Ges. 25, 1160 (1892).

J.I.Rood und R.G.Wilkinson

Affinity Chromatography of Clostridium Perfringens Sialidase: Non-Specific Adsorption of Hämagglutinin, Hämolysin and Phospholipase C to Sepharosyl-Glycyl-Tyrosyl-(N-(p-Aminophenyl)-Oxamic Acid)
Biochim.Biophys.Acta 334, 168 (1974).

T.Satoh, S.Suzuki, Y.Suzuki, Y.Miyaji und Z.Imai

Reduction of Organic Compounds with Sodium Borohydride-Transition Metal Salt Systems (1) Reduction of Organic Nitrile, Nitro and Amide Compounds to Primary Amines
Tetrahedron Lett. [London] 52, 4555 (1969).

G.Schmidt und S.J.Thannhauser

Intestinal Phosphatase
J.Biol.Chem. 149, 369 (1943).

S.Shaltiel

Hydrophobic Chromatography
in Methods in Enzymology (S.P.Colowick und N.O.Kaplan, Herausgeb.), Acad.Press New York, Vol. XXXIV, S.126 (1974).

S.Shaltiel und Z.Er-el

Hydrophobic Chromatography: Use for Purification of Glycogen Synthetase
Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 778 (1973).

T.K.Sharpless und R.Wolfenden

A Purified Nonspecific Adenosine Deaminase from Taka-Diastase
in Methods in Enzymology (S.P.Colowick und N.O.Kaplan, Herausgeb.), Acad.Press New York, Vol. XIIa, S.126 (1967).

E.Steers, Jr., P.Cuatrecasas und H.B.Pollard

The Purification of ß-Galactosidase from Escherichia coli by Affinity Chromatography
J.Biol.Chem. 246, 196 (1971).

W.Steinkopf

Über die Darstellung von Monobrom und Dibrom-Acetonitril
Ber.dtsch.chem.Ges. 41, 2694 (1905).

B.Svensson

Use of Isoelectric Focusing to Characterize the Bonds Established During Coupling of CNBr-Activated Amylodextrin to Subtilisin Type Novo
FEBS Lett. 29, 167 (1973).

I.P.Trayer, H.R.Trayer, D.A.P.Small und R.C.Bottomley

Preparation of Adenosine Nucleotide Derivatives Suitable for Affinity Chromatography
Biochem.J. 139, 609 (1974).

M.Zief und J.T.Edsall

Studies in the Physical Chemistry of Amino Acids, Peptides, and Related Substances. IX. The Dissociation Constants of Some Amino Acid Derivatives
J.Amer.Chem.Soc. 59, 2245 (1937).

7. Abkürzungen

A	Adenosin
ADA	Adenosin-deaminase
AHA	N^6-(6-Amino-2-hexenyl)-adenosin
AH-Adenin	N^6-(6-Aminohexyl)-adenin
AP	Alkalische Phosphatase
b	Ordinatenabschnit der Regressionsgeraden
BSA	Rinderserumalbumin
CPA	N^6-(5-Cyano-2-pentenyl)-adenosin
DHAHA	N^6-(2,3-Dihydroxy-6-aminohexyl)-adenosin
DHCPA	N^6-(2,3-Dihydroxy-5-cyanopentyl)-adenosin
E	Enzym
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
EL	Enzym-Ligand-Komplex
I	(gelöster) Inhibitor
J	Ionenstärke
K_i	Dissoziationskonstante des Enzym-Ligand-Komplexes
K_M	Michaelis-Konstante
K_s	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
L	(immobilisierter) Ligand
m	Steigung der Regressionsgeraden
6-MP	6-Mercaptopurin
6-MMP	6-Methylmercapto-purin
r	Regressionskoeffizient
S	Substrat
spez.Akt.	Spezifische Aktivität
U	Internationale Einheit der Enzymaktivität
v	Reaktionsgeschwindigkeit

8. Danksagung

Meinem Lehrer, Herrn Professor Dr. Friedrich Klink, möchte ich für die Überlassung des Themas und für die vielfältige Unterstützung meiner Arbeit am Institut sehr herzlich danken.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Professor Dr. Eberhard Riedel für sein förderndes Interesse an meiner Arbeit.

Meinen Mitarbeiterinnen Frau Erika Kaufmann und Fräulein Margrit Greve danke ich für die ausgezeichnete Hilfe bei der Durchführung zahlreicher Experimente.

9. Lebenslauf

Am 6. April 1943 wurde ich als Sohn des Bankkaufmanns Herrmann Becker und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Peters, in Karlsbad geboren. Mein Vater fiel im Oktober 1944. Nach dem Kriegsende flüchteten wir nach Preetz in Holstein. Hier heiratete meine Mutter den Volksschullehrer Werner Kulisch. Von 1949 bis 1953 besuchte ich die Grundschule in Preetz und ab Ostern 1953 die dortige Volksoberschule. Nach dem Abitur im Februar 1962 begann ich, an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel Chemie zu studieren. Die Diplomchemiker-Vorprüfung bestand ich im Mai 1965. Während des Wintersemesters 1965/66 und des Sommersemesters 1966 studierte ich an der Freien Universität Berlin. Die Diplomchemiker-Hauptprüfung bestand ich im Juni 1969 in Kiel. Von April 1970 bis April 1975 war ich wissenschaftlicher Angestellter am Biochemischen Institut im Fachbereich Medizin der Universität Kiel. Ich bin ledig und besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten W.Broser, B.Franck, W.Friedrichsen, R.Grewe, E.Hellner, R.Juza, H.Kleinfeller, F.Klink, W.Kroebel, W.Lochte-Holtgreven, G.Manecke, H.Martin, A.Mondon, H.Puff, G.P.Schiemenz, H.Thiele, K.Vetter und E.Vowinkel.